

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

(21)

N° 82 04053

Se référant : au brevet d'invention n° 81 04870 du 11 mars 1981.

(54)

Procédé d'analyse, par sorption différentielle d'un colorant métachromatique, des divers leucocytes du sang.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 33/52; A 61 B 5/14.

(22)

Date de dépôt 10 mars 1982.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *EUA, 11 mars 1981, n° 242.662.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 37 du 17-9-1982.

(71)

Déposant : KASS Lawrence, résidant aux EUA.

(72)

Invention de : Lawrence Kass.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Simonnot,
49, rue de Provence, 75442 Paris Cedex 09.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

Comme le brevet principal, la présente invention concerne un perfectionnement apporté au domaine de la cytologie et, plus particulièrement, un procédé d'examen et d'analyse, sous le microscope, des éléments figurés d'un sang encore vivant. En utilisant un seul colorant pur, sans fixation et de façon plus précise et rapide qu'on ne le pouvait jusqu'à présent à l'aide d'appareils manuels ou automatisés pour l'établissement d'une formule leucocytaire du sang, le procédé proposé permet d'effectuer, dans le champ d'un microscope, des opérations optiques de différenciation, d'identification, de comparaison et de numération, de chacun des globules blancs ou leucocytes appartenant à une série de globules blancs que l'on trouve dans du sang humain normal et/ou pathologique.

Ehrlich a permis de reconnaître plus facilement des éléments biologiques par examen au microscope et en vue d'une observation photographique en utilisant des colorations (à l'aide de colorants dérivés de l'aniline) pour identifier certains globules blancs du sang. Ehrlich a été le premier à noter que certains colorants sont métachromatiques, en observant que la coloration de la cellule oblige celle-ci à prendre ou absorber une couleur différente de celle du colorant ou de la couleur à laquelle on s'attendait d'après le colorant. On a observé, par exemple, que les globules basophiles prennent une couleur différente de celle du colorant. Il a également été indiqué que d'autres spécimens histologiques, différents des globules sanguins, se colorent en plusieurs couleurs différentes identifiables.

Un passage en revue de l'état de la technique indique qu'il est de pratique quasi-universelle d'appliquer, avant la coloration (qui utilise d'ordinaire plusieurs colorants chimiques différents mélangés), un mode opératoire de fixation pouvant exiger jusqu'à une demi-heure de traitement avant qu'on puisse soumettre le spécimen biologique au processus de coloration. Les fixateurs sont généralement des conservateurs et dénaturants qui nuisent

souvent à la sensibilité de la sorption du ou des colorants. Par exemple, les fixateurs comprennent le formaldéhyde, aussi bien sous forme liquide que de vapeur, des alcools absolus (méthylique), du picroformol, etc.

- 5 Très souvent, les cellules vivantes ne se colorent pas à l'aide de colorants vitaux et des fixateurs sont essentiels pour la coloration des spécimens. La cytochimie comprend des renseignements considérables sur les techniques mises au point pour assurer une coloration repro-
- 10 ductible des globules sanguins. De nombreux additifs essentiels sont normalement instables et se détériorent rapidement, ce qui rend difficile et parfois peu sûre l'identification des cellules. Le docteur Thomas E. Necheles a observé, à propos de l'analyse des leucocytes,
- 15 que "ce système a subi peu ou pas de changement en 50 ans".

Or, la coloration constitue bien un moyen pour discerner les détails qu'il serait impossible, sinon, de discerner, en soumettant à une réaction colorée des cellules et leurs constituants colorables, que ces consti-

20 tuants soient métaboliques, fonctionnels ou pathologiques.

Les hôpitaux des Etats-Unis d'Amérique ont commencé à dénombrer les leucocytes dès le début du 20e siècle en utilisant le dénombrement ainsi obtenu comme un indice permettant, par exemple, de savoir si une chirurgie

25 d'urgence est nécessaire. Dans les seuls Etats-Unis d'Amérique, on établit chaque jour plus d'un demi-million de formules leucocytaires du sang, la plupart du temps par des méthodes manuelles. Il est important d'effectuer des dénombrements de l'ensemble des globules blancs,

30 d'établir une formule leucocytaire et de transmettre sans retard les résultats obtenus. Le temps constitue un facteur essentiel et l'on souhaite toujours obtenir et transmettre plus rapidement les analyses requises.

La valeur du dénombrement des leucocytes et de

35 l'établissement de leurs proportions relatives ayant été établie, la demande tendant à obtenir une analyse rapide des éléments figurés du sang s'est développée de sorte qu'en commençant au voisinage de 1950 avec le travail de

Mellors et de Papaincolaou (1952), le développement des divers appareils automatisés pour l'établissement d'une formule leucocytaire a donné divers instruments en 1980. L'appareil "CYDAK" a servi très tôt à étudier s'il était possible de réaliser une classification des globules sanguins, ce qui a souligné l'importance des modes opératoires de coloration spécialisée, et des caractéristiques ont été extraites des histogrammes de la densité optique de chaque image de globule. Ce mode opératoire a établi la possibilité de différencier les globules en quatre des cinq classes de leucocytes, à savoir les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes et les monocytes. Young a publié en 1969 les résultats d'une classification automatisée des cinq classes de globules et Bacus a étendu en 1971 la différenciation.

On admet cependant que des systèmes de différenciation automatisée se fondent actuellement sur l'utilisation de plusieurs colorants et de systèmes de dégradation de colorants ou sur la mesure d'une fluorescence indirecte en faisant appel à des colorants fluorescents. Ces dernières méthodes sont décrites dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique n° 3 916 205 et n° 4 146 604. On notera dans ce cas également que le procédé ainsi décrit dans les brevets utilise des fixateurs, ce qui correspond à la pratique courante.

Dans la coloration des éléments figurés du sang selon la technique antérieure, il a été observé qu'il est de pratique courante d'utiliser deux ou plusieurs colorants combinés (colorations de Romanowski, Giemsa et Wright). Il est difficile d'assurer un contrôle de la qualité lors de la mise en pratique de ces méthodes. Elles exigent une standardisation de la préparation de chaque colorant faisant partie de la composition à utiliser, ainsi que du procédé de coloration des spécimens. Dans le développement des appareils automatisés pouvant établir avec succès une formule leucocytaire du sang, la reproductibilité de la coloration est encore plus importante pour permettre la vérification de l'analyse.

Mogler a indiqué en 1973 que la composition colorante "LARC" (utilisée dans des appareils automatisés du commerce pour l'établissement d'une formule leucocytaire) consiste en un mélange d'environ dix colorants dérivés de la thiazine, de l'éosine Y et de la 2¹, 4¹, R¹-tribromofluorescéine (P.N. Marshall). Les compositions colorantes actuelles se trouvent le plus souvent dans des solutions alcooliques de fixateurs et comportent deux ou plusieurs colorants en combinaison. Une analyse précise de la coloration vitale des éléments figurés du sang est ainsi rendue extrêmement difficile. Avec la difficulté présentée par l'oxydation réglée du bleu de méthylène, essentielle pour les colorations de Romanowski, par exemple, les problèmes de contrôle de la qualité des dix colorants différents individuellement ajoutés pour la coloration, tels qu'on les utilise en combinaison, deviennent impressionnants.

Il a été admis en pratique qu'une standardisation poussée et l'adoption d'un nombre limité de compositions colorantes garantiraient une plus grande précision et une meilleure reproductibilité des études cytologiques. On a observé que l'utilisation des fixateurs entraîne une introduction grave d'artéfacts, ce qui crée des difficultés d'interprétation et une mauvaise interprétation lors de la différenciation et de la numération des leucocytes. Il a été indiqué que des ajustements du pH, des cations de métaux lourds, constituent des facteurs empêchant des tests cytochimiques de s'effectuer de la façon attendue. Il a été noté que certains colorants, notamment les colorants azoïques, font apparaître une précipitation non spécifique autour des globules ; d'autres modifications de dégénérescence des échantillons de globules fixés du sang comprennent la formation de vacuoles, d'une structure en "feuille de trèfle" des noyaux, la distorsion des formes des globules, la présence de salissures et une gêne pour la réalisation d'une coloration parfaite. On admet l'importance d'effectuer le plus rapidement possible des dénom-

brements différentiels sur des cellules aussi vivantes que possible afin d'obtenir des formules leucocytaires d'une utilité et d'une valeur optimales. L'utilisation de solutions alcooliques de colorants gêne la coloration vitale. Pour autant qu'on le sache, des compositions colorantes hydrosolubles fraîchement préparées montrent le minimum d'effet de naturation lors de l'examen par coloration vitale des éléments figurés du sang. Tous les colorants sont plus ou moins toxiques pour les globules du sang, mais certains le sont plus que d'autres. Il est important que les globules examinés restent vivants aussi longtemps que possible. La rapidité de la coloration raccourcit bien évidemment le temps d'exposition, ce qui donne plus de chances d'examiner les leucocytes avant qu'ils ne perdent toute leur vitalité. On souhaite pouvoir établir par des moyens automatisés des formules leucocytaires du sang obtenues en un plus petit nombre de minutes.

Des études et un passage en revue de la manière antérieure d'effectuer sous le microscope des analyses des éléments figurés du sang et un diagnostic d'une maladie ont indiqué qu'il n'est pas inhabituel pour des pathologistes de réchauffer le colorant et l'échantillon de sang jusqu'à des températures d'environ 37°C, voisines de celle du corps, avant de réaliser le contact. Le docteur Sabin avait une "boîte chaude" pour garantir le réglage de la température.

Il a également été noté que certains colorants utilisés dans l'art antérieur sont très sensibles aux températures. La littérature indique que le violet cresylecht n'est pas utile comme colorant au-dessus de 30°C et que le rouge neutre plus couramment utilisé ne colore pas au-dessus d'environ 32°C. Aux fins du procédé ici décrit, on considère comme important que le colorant puisse colorer des leucocytes à des températures aussi élevées que 37°C, et l'on n'a pas observé de difficulté, avec les colorants choisis, jusqu'à des températures d'environ 40°C.

Le brevet principal a révélé que des colorants métachromatiques, en nombre relativement faible, peuvent servir à identifier une ou plusieurs espèces de leucocytes. L'identification et la différenciation concernaient spécifiquement des leucocytes polymorphonucléaires (neutrophiles), des basophiles, des lymphocytes en général et des monocytes. Il a été observé, à titre de caractéristiques communes pour tous les colorants s'avérant utiles aux fins du brevet principal, que lesdits colorants sont capables de colorer de manière métachromatique les monocytes de façon différente des autres leucocytes du groupe ci-dessus.

Les qualités inhabituelles du colorant basique orangé 21 (CI n° 48035 et courbe spectrale n° 7, figure 7 du brevet principal) ont été observées à propos des éosinophiles, des basophiles et des monocytes, mais, en raison du faible nombre des cellules B, celles-ci sont passées relativement inaperçues initialement. Il a été initialement observé dans le brevet principal qu'une différenciation optique entre des neutrophiles matures et immatures semblait possible du fait de la différence de couleur des granules matures par rapport aux granules immatures, qui sont comparativement plus rouges et orangés. Comme ce groupe, qui comprend des myéloblasts, des promyélocytes, des myélocytes, des métamyélocytes et des bandes, n'est pas toujours présent dans l'ensemble des échantillons de sang ou n'est pas présent en des nombres significatifs ou importants, comme c'est souvent le cas pour des lymphocytes T (globules ou cellules T) et des lymphocytes B (ou cellules ou globules B), tous n'ont alors pas été spécifiquement identifiés comme étant colorés de manière métachromatique et différenciée par l'orangé basique 21.

Après l'achèvement du travail qui a abouti à la demande de brevet principal, la poursuite de la recherche concernant l'utilisation de ce colorant remarquable a permis d'établir, au cours d'études semblables

effectuées sur des donneurs de sang, qu'il est possible, en utilisant ce colorant cationique basique choisi dans la classe des colorants méthiniques, polyméthiniques et de la quinoléine, de distinguer de manière reproductible, par suite d'une réponse métachromatique, certains lymphocytes. Il est possible en outre d'identifier au moins dix granulocytes bien connus et des cellules lymphocytiques dont on admet en pratique l'intérêt vital pour les sciences de la santé.

10 En outre, cette différenciation est immédiate ; elle ne nécessite pas de prétraitement biochimique complexe ou difficile des échantillons de sang. De plus, on a noté que le colorant présente le minimum possible de toxicité.

15 On a effectué des mesures de microspectrophotométrie en utilisant une ouverture assez petite pour mesurer la couleur des granules des cellules granulocytiques parmi les leucocytes soumis à une coloration vitale. Aucune autre partie de cellule, prise en compte à un certain degré dans les mesures, ne s'est avérée présenter des coefficient d'extinction des couleurs des différentes espèces de leucocytes qui ont constamment été différentes et ont souvent présenté des différences de nuances, de valeur ou de couleur de l'ordre de 50 nanomètres. Il y a eu des pics reconnaissables, existant constamment pour 25 de nombreuses cellules. On sait que les différences de l'ordre de 5 nm sont importantes dans des mesures microspectrophotométriques, si les différences sont constantes et reproductibles.

30 Parmi les cellules granulocytiques immatures immédiatement identifiables et distinguables les unes des autres, il y a des myeloblastes de la série myéloïde, à savoir des promyélocytes, des myélocytes et des métamyélocytes. On pense, et l'on admet généralement, que ce sont des précurseurs des leucocytes polymorphonucléaires 35 ou neutrophiles, qui se colorent également de façon métachromatique, de manière à pouvoir être facilement

et rapidement distingués, identifiés et dénombrés par les analyses de sang encore vivant devenues possibles du fait des progrès ici décrits.

5 Comme décrit dans le brevet principal, on peut en même temps distinguer des neutrophiles, des éosino-
philes, des basophiles, des lymphocytes et des monocytes les uns des autres et de leurs précurseurs précités s'ils
sont tous présents dans un échantillon spécifique de sang soumis à des analyses microspectrophotométriques.

10 Il a de plus également été trouvé que ce colorant remarquable donne une forme optiquement différente de couleur ainsi qu'une densité différente de chaque couleur
de granules dans des lymphocytes de type "bande". Ainsi, cette qualité de leucocytes peut aussi être remarquable-
15 ment séparée, par différenciation optique, des autres cellules d'aspect immature, identifiées ci-dessus. Il existe un tel degré d'amplitude de différences de couleurs,
d'agencement et de densité de couleur qu'un opérateur compétent peut effectuer une numération de toutes les
20 cellules individuellement désignées ci-dessus. Les renseignements actuellement disponibles indiquent également qu'un équipement de numération différentielle automatique
sera développé en se fondant sur des différences dues à la présence ou à l'absence de couleur et aux
25 formes physiques établies dans le noyau et en tenant compte de ces différences et notamment des différences relatives en nombre, dimensions, agencement ou forme et nuances,
valeur et couleur et densité de couleur dues aux divers granules présents dans le cytoplasme.

30 La possibilité de différencier des lymphocytes B, ou cellules ou globules B, par rapport à des lymphocytes T ou des cellules ou globules T, est presque incroyable
mais a été également mise en évidence au cours de la recherche fondamentale effectuée jusqu'à présent. Il est
35 également possible d'identifier optiquement chacun de ces lymphocytes importants, l'un par rapport à l'autre, qualitativement et quantitativement, en utilisant le

même colorant dans la même analyse de sang encore vivant sans fixateur et aussi de distinguer et de dénombrer les cellules T et les cellules B parmi chacune des catégories individuelles de cellules, d'aspect immature et mature, précitées, y compris les "bandes".

Comme indiqué dans le brevet principal, les monocytes manifestent également une réponse métachromatique et peuvent de même être identifiés et dénombrés, comme indiqué dans le brevet principal, sans gêner les analyses microscopiques précitées de lymphocytes décrites.

Il convient également de mentionner que les plaquettes sanguines, qui sont de petites particules distinctes analogues à la poussière, jouant un rôle dans l'arrêt des saignements et hémorragies, peuvent être identifiées et comptées, d'après leur coloration en orange. Leur nombre constitue également un indice intéressant de la qualité du sang.

La découverte de la capacité de l'orangé basique à différencier de façon supplémentaire des myéloblastes et des globules sanguins de la série myéloïde, ainsi que des bandes et des lymphocytes T et lymphocytes B étend, de façon inattendue, le champ originel potentiel d'utilité du colorant au-delà de ce qui avait été admis dans le brevet principal. Des fractions de fluides, associées dans des échantillons de sang encore vivant à du tissu sain ou à du tissu soupçonné d'une anomalie, comme du plasma, de la lymphe, du sérum, etc, contenant une ou plusieurs des cellules ci-dessus, peuvent, après coloration métachromatique, être examinées au microscope pour différencier chaque espèce de cellules indiquées ci-dessus, ce qui permet une numération et une étude comparative.

Ce progrès, associé à ce qui a été décrit dans le brevet principal, constitue un progrès sans pareil en hématologie, cytologie et immunologie, et permet d'envisager et de conduire des recherches planifiées dans un domaine illimité de la santé humaine. On a ainsi diminué de façon considérable et mesurable, la nécessité

de faire appel à des réactifs coûteux, de consacrer un temps de valeur inestimable à de la recherche et l'on a permis de rassembler des données extrêmement plus précises.

L'invention étend également, au-delà des limites
5 actuellement admises, l'horizon dans le domaine du diagnostic des maladies.

Jusqu'au présent exposé, environ un millier de colorants connus différents, dont certains ne sont plus fabriqués et n'ont été disponibles qu'en raison de
10 recherches poussées, ont également été soumis à des investigations en vue de tenter de trouver des chemins menant à des colorants utiles pour le large but des analyses et études de fractions d'échantillons de sang maintenus en vie. Les essais de classes innombrables de colorants,
15 qui diffèrent tant par leur structure chimique que par la classification de leurs groupes chromophores, n'ont pratiquement pas donné de résultats qui ne soient pas théoriquement décevants, la métachromasie étant très rarement constatée mais ne l'étant exclusivement dans
20 aucune classification connue. On a cependant noté que la classe des composés cationiques quaternaires basiques paraissait plus intéressante que n'importe quel autre groupe actuellement connu.

Au cours des études qui ont servi de base à la
25 présente demande, on a soumis à des essais, en vue d'identifier des leucocytes, vingt colorants méthiniques et polyméthiniques ayant des nuances de teintes de rouge basique, orangé basique et violet basique. Dans le premier groupe des neuf rouges basiques, quatre seulement ont
30 provoqué une coloration immédiate du noyau des monocytes, mais peu ou pas de coloration des autres types de cellules ou globules. Cette série comprenait le rouge basique 13, cité dans le brevet de base, et les rouges basiques 35, 36 et 39 qui ont fait par la suite l'objet d'études.
35 Parmi les six colorants méthinique et polyméthinique de type violet basique utilisés dans les essais, les violets basiques 7, 15, 16 (décrits dans le brevet de base),

39 et 40 colorent aussi instantanément et sélectivement les monocytes.

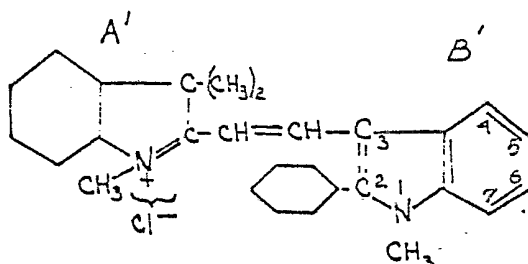
On a également soumis à des essais pratiques six colorants polyméthiniques de type orangé basique.

- 5 L'orangé basique 21 est remarquable dans cette série, car il colore non seulement nettement des monocytes, mais il colore instantanément aussi, chacun de façon différente, un certain nombre d'autres leucocytes.

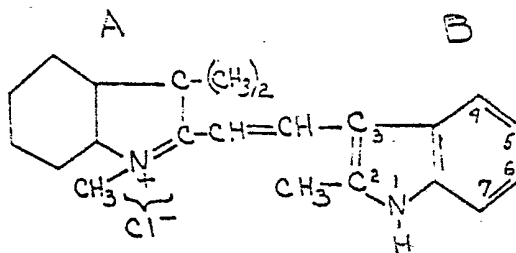
- 10 Il est important de noter que les 20 colorants polyméthiniques et méthiniques se situent, après étude de tous les colorants actuellement disponibles dans le monde ainsi que des colorants considérés comme périmés à l'échelle commerciale, dans le cadre des classes de colorants méthiniques et polyméthiniques que les recherches
15 effectuées par le présent inventeur, parmi les colorants antérieurs, ont permis de mettre en évidence. Le brevet principal décrit une étude portant sur 18 colorants de la série des carbocyanines, dont un seul présente des caractéristiques analogues de coloration métachromatique
20 de monocytes. Les colorants de type carbocyanine, quinoniques et méthiniques et polyméthiniques ont souvent une structure chimique très semblable.

- Une étude détaillée et spécifique de la structure de l'orangé basique 21 (Color Index n° 48035), décrit dans
25 le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 2 126 852, a conduit à essayer l'orangé basique 22 (Color Index n° 48040). Une étude des deux structures chimiques (indiquées ci-après) ainsi que des essais de laboratoire ont conduit à des résultats étonnants. Il semble bien en résulter que
30 l'orangé basique 22 ne présente absolument aucun degré de métachromasie utilisable aux fins de la présente invention, alors que les structures chimiques des deux composés sont extrêmement voisines :

Orangé basique 22 CI 48040



Orangé basique 21 CI-48035



L'étude de ces structures indique que les seules différences à observer concernent le radical indolyle de chaque orangé basique, indiqué en B et B¹ dans les formules de structure ci-dessus. La différence concerne la présence du groupe méthyle en position 2, dans le cas de l'orangé basique 21, et en position 1 dans le cas de l'orangé basique 22, c'est-à-dire la substitution sur un atome de carbone dans le cas de l'orangé basique 21 et sur un atome d'azote dans le cas de l'orangé basique 22. Dans l'orangé basique 22, la position 2 libre, du fait de la présence du groupe méthyle en position 1, est occupée par un substituant phényle supplémentaire.

Au cours de plus de trois années de recherche sur des colorants extrêmement variables et appartenant à différentes classes chimiques, il n'a pas été possible jusqu'à présent de trouver une base permettant de prédire la métachromasie. Le plus fréquemment, on a trouvé de la métachromasie dans le cas des colorants cationiques

basiques quaternaires et, relativement plus fréquemment, parmi les méthines et polyméthines.

Des documents de référence de l'art antérieur indiquent qu'il n'est pas inhabituel, dans des analyses
5 sur des échantillons encore vivants, d'utiliser, comme vérification essentielle des résultats, trois concentrations du colorant dans trois préparations de lamelles. Dans le cas de l'orangé basique 21, les différences de couleurs sont si nettes et les couleurs si exceptionnel-
10 lement vives que l'on peut facilement distinguer, instantanément, avec un seul colorant et une seule lame de préparation, les granules primaires des granules secondaires.

La présente invention constitue un progrès en cytologie en proposant un seul colorant organique catio-
15 nique ou quaternaire basique, de la série des colorants méthiniques et polyméthiniques, qui est sorbé de façon métachromatique par un ou plusieurs leucocytes du sang périphérique, ce qui perfectionne de façon inhabituelle l'identification et la différenciation des éléments
20 immatures et matures des divers éléments figurés de la série myéloïde ou granulocytaire et des globules blancs matures. Jusqu'à présent, il fallait utiliser des moyens cytochimiques et des colorants complexes pour différencier les globules sanguins, ce qui nécessitait souvent au moins
25 une heure de préparation fastidieuse en vue d'analyser au microscope, par différenciation et numération, une seule espèce de leucocytes connus.

Dans la pratique de la présente invention, on peut maintenant colorer de façon différentielle et
30 identifier, précisément et facilement, à l'aide d'un seul colorant pur (auquel on peut combiner d'autres colorants pour des études spécifiques), au cours d'un simple contact aqueux avec un échantillon de sang veineux périphérique ou avec une fraction d'un tel sang, ce qui
35 comprend des échantillons enrichis en leucocytes, chacune des espèces ou chacun des types suivants de précurseurs, de globules blancs du sang, de plaquettes, etc. Ces

espèces comprennent des myéloblastes, des promyélocytes, des myélocytes, des métamyélocytes, des bandes, des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles, des lymphocytes B, des lymphocytes T et des monocytes. Les
5 plaquettes peuvent également être identifiées et comptées, mais elles ne présentent pas de métachromasie.

En sorbant ou en ne sorbant pas le colorant dans certains cas, chaque espèce de leucocyte se différencie en réfléchissant une image caractéristique ayant des
10 couleurs différentes identifiables spectralement, en sorbant d'autres couleurs du spectre de la lumière normale, ce qui comprend principalement la lumière visible mais n'exclut pas l'infrarouge ou l'ultraviolet, qui peuvent devenir importants pour un équipement automatique non
15 limité par la réponse ou la sensibilité de l'oeil humain. Il n'est cependant nullement nécessaire de se fonder sur une réponse de fluorescence.

Ainsi, chacune des espèces individuelles citées peut être différenciée de ses voisines, chaque espèce peut
20 être comptée, on peut déterminer le nombre total de chaque espèce présente, on peut étudier la morphologie de chaque espèce et l'on peut effectuer de nombreuses déterminations d'une grande valeur pour les sciences de la santé.

Fondamentalement, chacun des globules blancs du
25 sang précité ou des leucocytes sorbe de manière différente la lumière provenant du même colorant métachromatique pur, selon la qualité du colorant, l'espèce de leucocyte et la réception du colorant par des éléments des cellules spécifiques présentes dans l'échantillon, ou la fraction
30 d'échantillon, que l'on analyse.

En l'absence de fixateurs, le colorant basique utilisé selon la présente invention est sorbé de manière métachromatique, de sorte que chaque classe, type ou
35 espèce de leucocytes, de lymphocytes ou de granulocytes reflète un spectre caractéristique de lumière ou une couleur différente de chaque autre classe, type ou espèce de blastocytes, cellules myéloïdes, leucocytes ou

granulocytes présents dans l'échantillon. Pour autant qu'on le sache jusqu'à présent, la métachromasie étonnamment vive du colorant orangé unique de la présente invention est remarquable et même unique en son genre.

- 5 Chaque espèce de la série comprenant les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes, les bandes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes B, les lymphocytes T et les monocytes, sorbe ainsi le colorant métachromatique unique
10 de manière à réfléchir un spectre lumineux distinctif ou une couleur de la lumière visible. Des combinaisons du colorant, dont l'utilisation est décrite dans le présent mémoire, avec d'autres colorants, comme suggéré dans le brevet principal, peuvent être utiles pour
15 certaines analyses de leucocytes indiquées dans ce brevet principal.

On note que, pour identifier l'orangé basique 21 et les colorants cités dans le brevet principal, le principal critère consiste en la courbe spectrale.

- 20 Le brevet principal a décrit la découverte d'un groupe de colorants métachromatiques remarquables pouvant servir isolément, mais souvent en combinaison, pour identifier et distinguer cinq espèces de globules blancs du sang, à savoir les neutrophiles, les éosinophiles,
25 les basophiles, les lymphocytes et les monocytes, les uns par rapport aux autres, lorsqu'ils sont présents dans un échantillon de sang humain.

- La présente invention se fonde sur la découverte de la capacité du colorant connu sous le nom de orangé
30 basique 21 (figure 1 annexée ; courbe spectrale n° 7 du brevet principal), lorsqu'on l'utilise seul dans un milieu aqueux en appliquant une technique d'analyse vitale du sang sur un échantillon ou une fraction sans fixateur, à colorer de manière métachromatique inhabituelle et
35 distinctive les globules sanguins des plaquettes du sang humain de la série décrite ci-dessus.

Cette possibilité d'identification de chaque membre de la série, l'un par rapport à l'autre, est le reflet d'une amplitude remarquable de leur différenciation possible.

5 L'art antérieur permet de distinguer et d'identifier, par des moyens complexes, les globules sanguins précités, mais cet art antérieur ne suggère pas, même de loin, la possibilité d'identifier et de différencier les
10 uns par rapport aux autres chacun des membres ou chaque espèce de la série précitée.

L'orangé basique 21 peut également s'identifier par l'indication de son numéro dans le Color Index (Color Index n° 48035), par sa structure chimique (voir sa
15 formule ci-dessus) et par les courbes spectrales apparaissant sur la figure 1 annexée. La figure 2 annexée présente la courbe spectrale n° 2 identifiant le bleu borrel, car le brevet principal a suggéré d'utiliser ce colorant en
20 combinaison avec l'orangé basique 21 à certaines fins. On notera que la courbe supérieure, qui possède en général les pics les plus bas et la plus grande fréquence de
25 variations de pente, représente la réponse en lumière ultraviolette, cependant que les courbes initialement inférieures, qui ont des pics en général plus élevés et présents en un plus petit nombre, correspondent à la réponse en lumière visible.

Bien qu'on ne souhaite pas se lier par une théorie, on peut indiquer qu'il est bien connu que presque
30 n'importe quel additif étranger a tendance à dénaturer les matières protéiniques. L'expérience a indiqué que la fixation gêne la coopération entre le métachromatisme du globule et la qualité métachromatique du ou des colorants
utilisés selon la présente invention. En appliquant une technique de "coloration vitale", c'est-à-dire en colorant
à l'aide de "colorants vitaux" un échantillon sans fixa-
35 teur, on évite également de former des artéfacts ennuyeux dans le champ d'examen.

Dans la pratique de la présente invention, la coloration est assez instantanée pour qu'aux températures normales du sang (37°C), le cytologiste ne soit pas obligé d'attendre, ni de faire appel à de la cytochimie fine avant que ne se produise le développement de la couleur des globules et une différenciation spectrale des membres précédemment énumérés de la famille des leucocytes, des lymphocytes et des cellules granulocytiques, avant de commencer ses études sous le microscope, en utilisant un équipement manuel ou un équipement automatisé pour la numération différentielle des leucocytes (ou la détermination de la formule leucocytaire du sang).

Comme indiqué dans le brevet principal, voici des catégories et types d'échantillons de sang sans fixateur que l'on peut utiliser :

1. Du sang entier additionné d'un anticoagulant (E.D.T.A., citrate, héparine) ;
2. Des suspensions de leucocytes obtenues par sédimentation, à l'aide de dextrane et/ou par gravité, d'un sang entier additionné d'un anti-coagulant ;
3. Des échantillons de sang entier traités par une solution hypotonique pour lyser les globules rouges du sang, ce qui laisse principalement les globules blancs et les plaquettes ;
4. Des échantillons d'autres fluides corporels, comme du fluide spinal, pleural ou ascitique, ainsi que des échantillons d'un fluide d'articulation ou de tissus conjonctifs dans lesquels les globules blancs du sang sont intéressants.

La présente invention ne propose pas spécifiquement un équipement automatisé pour l'établissement d'une formule leucocytaire du sang, mais de tels systèmes et équipements ont fait, et continuent de faire, l'objet d'un examen en profondeur.

On peut notamment citer la publication d'une série d'articles, dans une collection intitulée "Differential Leukocyte Counting" (Etablissement de la formule leucocytaire du sang), par la Conférence du Collège des Pathologistes Américains (Aspen, Colorado, août 1975), ainsi que les brevets des Etats-Unis d'Amérique n° 3 916 205 et n° 4 146 604 (Kleinerman). On note que les brevets précités supposent une fixation des cellules, qui est habituelle dans les études de leucocytes sous le microscope et parfois l'utilisation de certains colorants fluorescents.

L'art antérieur indique plusieurs niveaux de discrimination lors de l'établissement d'une formule leucocytaire du sang. La différenciation entre des globules polymorphonucléaires et des globules "mononucléaires" a une importance fondamentale et principale. A un niveau intermédiaire, la différenciation des polymorphes ou polynucléaires en des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles, et la séparation des "mononucléaires" entre des monocytes et des lymphocytes, sont considérées comme possibles en principe.

Un troisième niveau apparent de difficultés implique la différenciation des neutrophiles en des formes immatures et matures, et la division des lymphocytes en des types normaux et réactifs, ce qui a été mentionné dans le brevet principal. Pour autant qu'on le sache actuellement, le présent exposé propose le seul procédé permettant de différencier simplement, à l'aide d'un seul colorant pur, les blastocytes, les leucocytes de la série myéloïde ou des granulocytes, les bandes, les leucocytes polymorphonucléaires (neutrophiles), les éosinophiles, les basophiles, les globules B et les globules T ainsi que les monocytes et plaquettes, le tout à l'aide d'un seul colorant et d'une seule fraction échantillon.

La technique des équipements automatisés d'établissement d'une formule leucocytaire du sang se trouve actuellement en état de développement en ce qui

concerne l'utilisation de la lumière blanche et d'un seul colorant aqueux. On semble principalement faire appel, pour les comptages différentiels, à un équipement manuel et à des opérations préliminaires complexes.

- 5 On affirme que l'équipement automatisé appartient à deux groupes généraux ou classes : 1) les dispositifs de reconnaissance des structures ; et 2) les dispositifs de différenciation cytochimique. Il en ressort que les méthodes de coloration de l'art antérieur servent avec
10 plus ou moins de succès et que des opérateurs utilisant des machines peuvent suivre l'opération sur la base d'une étude ou d'une numération cellule par cellule. Habituellement, on n'effectue une numération différentielle que sur 100 cellules. Si les systèmes cytochimiques
15 sont précis, ils ont encore besoin du développement de dispositifs satisfaisants d'étalonnage, et ils exigent des opérateurs hautement qualifiés.

- Un bref examen d'ensemble des procédés de l'art antérieur faisant appel à de la fluorescence fait ressortir
20 les points suivants : (1) la présence d'au-moins deux sources de lumière est essentielle, ce qui comprend la lumière violette et ultra-violette ; (2) une troisième source de lumière semble également nécessaire ; (3) le système semble exiger des colorations effectuées à
25 l'aide de plusieurs colorants fluorescents pour permettre d'identifier et de différencier les types et espèces de leucocytes ; (4) le système exige l'emploi de frottis de sang fixés à l'alcool ; (5) le temps nécessaire pour la coloration est de l'ordre de 10 minutes ; on rince
30 durant une minute puis l'on sèche ; (6) il semble que l'intensité de la fluorescence diminue dans l'ordre suivant : (a) les eosinophiles vers b) les neutrophiles vers (c), les monocytes vers (d), les lymphocytes (l'identification des basophiles n'est pas décrite dans l'art
35 antérieur) ; (7) dans un système comportant des tubes à écoulement, les globules sanguins sont fixés par du formaldéhyde et colorés par trois solutions colorantes

différentes ; (8) un comptage différentiel et une classification de la fluorescence des leucocytes décelés sont réalisés à l'aide des taux ou rapports entre la lumière fluorescente ; (9) un des brevets cités ne décrit que l'identification de quatre seulement des cinq types ou espèces de leucocytes ; (10) trois colorants fluorescents sont spécifiés ; il faut les combiner pour produire une composition dite de "colorant unique", et cette combinaison semble essentielle, et pas seulement avantageuse, pour la mise en oeuvre du procédé antérieur décrit.

Dans le présent exposé, seule de la lumière blanche ordinaire est essentielle. Il n'est pas nécessaire d'en faire varier l'intensité. On peut utiliser l'un seulement des colorants ou des solutions colorantes que le brevet principal a décrit, pour utiliser vraiment "un seul" colorant pur. Cependant, il a été également découvert que l'on peut également utiliser isolément ou en combinaison les colorants purs du brevet principal, comme cela est également vrai pour le colorant ici cité, pour amplifier ou augmenter la différenciation spaciaie dans le cas de l'analyse d'un seul échantillon de sang humain.

Les procédés ici décrits se fondent sur une technique de "coloration vitale". La présente invention permet d'envisager la mise au point et l'utilisation, notamment en hôpital, d'un système de surveillance continue pour le diagnostic et le traitement, notamment lorsqu'une observation directe et continue des globules blancs du sang est importante et souhaitée.

Les expressions de coloration vitale et de colorant vital n'excluent pas la possibilité d'une perfusion continue, à l'aide d'un circuit dérivé partant des vaisseaux sanguins d'organismes vivants, et la possibilité d'une surveillance ou d'un monitoring en continu de l'ensemble des globules blancs possibles, pendant leur passage dans un tube spécialisé de dérivation

en vue de l'observation et de la numération.

On sait que la plupart des colorants sont toxiques lorsqu'on les utilise dans des conditions de coloration vitale. L'orangé basique 21 est actuellement, 5 le colorant considéré comme le moins toxique aux fins de la présente invention. Il a été noté dans l'art antérieur que les globules blancs sont facilement endommagés si tous les globules rouges sont colorés dans une boîte chaude à 37°C. L'art antérieur a également noté que si 10 un groupe de cellules ou de globules subit des stimulations ou des dégâts, la réaction à des colorants peut se modifier nettement. Il n'est pas inhabituel que certaines colorations de l'art antérieur demandent des périodes relativement longues, de l'ordre d'une demi-heure, 15 pour obtenir le maximum d'intensité de couleur. Le colorant de la présente invention colore quasi instantanément les lymphocytes et leucocytes, et l'on n'a pas besoin d'un temps quelconque après ce contact. Ainsi, les globules sont soumis à un examen pendant qu'ils sont sous la forme 20 la moins dénaturée actuellement connue. On sait que des temps excessifs d'exposition peuvent gêner la différenciation initialement nette.

En raison des limitations inhérentes au procédé panoptique de coloration d'échantillons, on a conçu au 25 cours des diverses décennies passées un certain nombre de tests cytochimiques en vue de distinguer plus précisément un type de globules sanguins d'un autre. En général, ces tests sont destinés à déceler l'accroissement de la quantité d'un type de substance, dans une cellule ou un 30 globule particulier, en comparaison d'un autre globule ou d'un autre type de substance, ou bien à déceler une ou des substances dans un organite cellulaire caractéristique d'une cellule en comparaison d'un autre organite ou d'une autre cellule. Par exemple, l'activité d'estérase non 35 spécifique est inhabituellement élevée chez les monocytes, et cette activité semble particulièrement sensible à une inhibition par du fluorure de sodium. De même, l'identifi-

cation des granulocytes dépend dans la plupart des cas de la mise en évidence de propriétés de lysosomes. Dans ce but, la détection des activités de myéloperoxydase et d'estérases spécifiques s'est avérée utile pour des tests cytochimiques. Les granules de lysosome des eosinophiles contiennent de la myéloperoxydase capable de résister à une inhibition par du cyanure de sodium, et les granules des basophiles peuvent subir une coloration métachromatique à l'aide de divers colorants, en raison notamment à leur teneur élevée en des substances cationiques comme l'héparine.

La prolongation des études effectuées avec l'orangé basique 21 a montré un développement surprenant par rapport au brevet principal. Il avait été noté initialement que l'orangé basique 21 présente certaines qualités inhabituelles, et le présent mémoire vérifie les observations initiales ainsi notées.

Comme on l'indique ici, le noyau des monocytes ne se colore pas, mais l'on identifie les monocytes par différenciation de la couleur du cytoplasme et des granules.

En comparaison des colorations cytochimiques classiques en vue de l'identification des monocytes, des leucocytes neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles, une coloration vitale des leucocytes du sang périphérique par l'orangé basique 21 présente plusieurs avantages. Cette coloration est avantageuse parce qu'elle est rapide et demande moins de 2 minutes pour le développement maximal de la couleur. Elle est également avantageuse car elle évite d'utiliser des substrats synthétiques, des colorants azoïques complexes et des agents de copulation ou de couplage que l'on utilise dans des tests cytochimiques classiques. Les tests cytochimiques antérieurs sont difficiles à interpréter en raison de la précipitation non spécifique des réactifs colorés, de la détérioration des substrats et de la nécessité d'ajustements complexes du pH et de la teneur en ions métalliques.

La technique de coloration vitale, qui utilise des globules vivants du sang et leurs affinités différentielles pour une coloration vitale de ces globules et cellules par des colorants aqueux dilués, sans fixateur, évite l'apparition d'artéfacts que l'on trouve souvent dans le cas de la mise en oeuvre des fixateurs classiques. Il semble bien que la technique de coloration vitale ainsi proposée détermine une réflexion plus précise que dans le cas des colorations classiques actuellement utilisées de la localisation du colorant dans les cellules (par exemple en mettant en évidence des lysosomes, des structures fibrillaires, de la chromatine nucléaire). L'expérience déjà acquise, et celle que l'on continuera d'acquérir, ainsi que les perfectionnements apportés à la technique d'un établissement automatisé de la formule leucocytaire du sang ou d'un établissement automatisé d'une numération des globules du sang permettront à la coloration vitale, sans fixateur, des leucocytes du sang périphérique d'introduire une addition importante au domaine de la cytochimie.

Il convient de noter que la nomenclature d'identification de l'orangé basique 21 provient du Color Index. Ce composé est également identifié par d'autres noms. En raison de la possibilité de confusion de nomenclature, et du fait que si l'orangé basique 21 est remarquablement fonctionnel, son voisin le plus proche dans le Color Index, l'orangé basique 22, présentant une structure chimique presque identique (voir ci-dessus) ne fonctionne pas et ne manifeste pas de métachromasie aux fins de la présente invention, on se fonde ici sur les courbes spectrales et sur la structure chimique connue pour identifier le ou les colorants cationiques quaternaires spécifiques de la présente invention. Il est intéressant de noter que tous les colorants considérés comme fonctionnels dans la présente invention identifient parfois l'état chromatique des monocytes.

Il est commode, en ce point de l'exposé, de se référer à la figure 3 qui peut permettre de comprendre

l'identification et la différenciation des leucocytes, que permet le progrès ici décrit. On comprendra cependant que l'expérience, réalisée "sur le terrain", met mieux en évidence les variations de couleurs qu'une figure en

5 noir et blanc.

Tous les globules sanguins semblent provenir de cellules souches non différenciées et appelées cellules du mésenchyme. Les descendants immédiats des cellules souches sont appelés blastes et l'on admet que les

10 myéloblastes spécifiques engendrent les leucocytes différenciés et rendus identifiabiles et dénombrables lorsqu'on les expose à de l'orangé basique 21, dans un milieu environnant aqueux sans fixateur, en vue d'une analyse vitale. Les myéloblastes sont identifiés ici par

15 l'absence de granules de lysosome qui identifient de manière caractéristique, par leur sorption d'un colorant métachromatique, les trois cellules descendantes dans la série ou lignée myéloïde. Les trois cellules descendantes, à savoir des promyélocytes, des myélocytes et des méta-

20 myélocytes, sont, chacune, identifiées séparément par la coloration métachromatique et différentielle et par la distribution de la couleur, comme on le décrira.

On identifie facilement les promyélocytes par les observations manuelles ou automatiques suivantes. Ce sont

25 généralement les cellules ou globules ayant les plus grandes dimensions parmi les cellules de la série myéloïde représentées. Le noyau ovale N-1 n'est pas coloré par l'orangé basique 21 et il constitue une partie relativement grande du granulocyte total. Le cytoplasme comporte un

30 garnissage étroit ou serré d'un grand nombre de granules primaires 1, relativement petits et de couleur rouge-orangé, et l'on peut également observer la présence de quelques granules épars 2, de couleur violette, qui sont généralement distribués dans la masse des granules rouge

35 orangé.

Les myélocytes possèdent également un noyau N-2 ovale, non coloré, de surface et volume légèrement moindres.

Le fait distinctif remarquable consiste en le net développement, dans le myélocyte, de plus gros granules secondaires jaunes 4, formant un croissant qui s'épaissit généralement dans la cellule du myélocyte immature. Deux
5 lignes imaginaires $a - a^1$ entourent et délimitent le nombre croissant de gros granules secondaires 4 jaunes des myélocytes par rapport au nombre décroissant de granules primaires 6 plus petits et de couleur rouge orangé. On peut observer que les myélocytes se distinguent
10 des promyélocytes par le développement isolé notable de gros granules secondaires jaunes 4.

Les métamyélocytes comportent également un noyau N-3 non coloré qui commence à présenter le développement d'une structure ou forme lobulaire, se distinguant de la
15 forme ovale antérieurement décrite pour la première cellule de la série myéloïde. Les petits granules primaires 6, de couleur rouge orangé, forment une masse qui diminue et occupe une surface proportionnellement mineure de la surface totale du cytoplasme C-2 observé pour cette
20 cellule. D'assez gros granules secondaires 8, de couleur jaune, semblent déplacer une partie centrale importante du noyau N-3 non coloré, antérieurement ovale, ce qui explique la modification que l'on entend décrire par le passage "d'une forme ovale à une forme lobulaire".

25 Des bandes se distinguent progressivement et elles ont été séparées des trois premières cellules décrites, montrant la coloration métachromatique des granules et faisant partie de la série myéloïde.

Pour autant qu'on le sache, les bandes n'ont pas
30 été jusqu'à présent distinguées de l'ensemble des autres leucocytes par la métachromasie d'un colorant quelconque.

Les bandes se distinguent de tous les autres leucocytes par la présence d'un noyau N-5 de forme lobulaire, non coloré, qui, comme la dimension globale des bandes,
35 a nettement diminué en surface ou en volume en comparaison des leucocytes constituant les formes antérieures dans la série myéloïde. De plus, la forme lobulaire du noyau N-5

non coloré est devenue plus bifurquée du fait de la poursuite de la croissance du cytoplasme C-6 vers l'intérieur de ce noyau. La croissance, par augmentation du nombre des granules secondaires jaunes 12 dans le cytoplasme, a déplacé la quasi-totalité des autres granules primaires 10, plus petits, de couleur rouge orangé qui ne forment plus qu'un très petit amas. On note que les granules 10 de l'amas se situent spécifiquement dans le prolongement ou mouvement du cytoplasme C-6 vers l'intérieur du noyau N-5 tendant à segmenter ce noyau. De plus gros granules secondaires jaunes 12 ont réussi à "coloniser" le cytoplasme C-6, sauf ce groupe à couleur contrastée caractéristique des bandes. Le point important de séparation des bandes consiste en le petit amas de granules rouges 10 dans le cytoplasme C-6 en 10.

Il est suggéré que ce point important de différenciation des bandes par rapport à tous les autres leucocytes est extrêmement utile pour le développement d'un équipement automatisé destiné à percevoir les petits granules primaires 10, de couleur rouge orangé, entourés par un nombre largement prédominant de plus gros granules secondaires 12 de couleur jaune.

La possibilité de distinguer, d'identifier et de compter facilement, rapidement et certainement des bandes parmi tous les autres leucocytes à l'aide d'un seul colorant, comme décrit ci-dessus, va au-delà des espoirs et au-delà de toute théorie connue sur le rôle et la fonction des bandes.

Les neutrophiles sont des globules blancs matures du sang et le brevet principal a indiqué qu'on peut les reconnaître parmi les cinq classes principales de globules blancs intéressants. D'autres détails intéressants viennent d'être établis.

Sur des dessins ne reproduisant pas les couleurs, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles semblent tous présenter une configuration physique relativement semblable. Lorsqu'on utilise de l'orangé

basique 21 comme seul colorant vital dans un environnement sans fixateur, on identifie les neutrophiles par la présence, dans le cytoplasme C-8, de granules secondaires 16 qui sont surtout de couleur jaune. Le noyau N-8 n'est pas coloré et il est généralement segmenté. Les gros granules secondaires jaunes 16 constituent la surface ou masse majeure du cytoplasme C-8.

Les éosinophiles possèdent également un noyau segmenté et non coloré N-10, mais leurs gros granules secondaires 18 se différencient de ceux des neutrophiles et des basophiles par leur couleur orangée qui constitue la caractérisation et même la principale caractéristique du cytoplasme C-10.

Le noyau segmenté N-12 des basophiles n'est également pas coloré par l'orangé basique 21, mais les granules secondaires 20 diffèrent des granules des neutrophiles 16 et des éosinophiles 18 du fait que les granules 20 des basophiles subissent une coloration métachromatique en cramoisi ou pourpre présentant une faible nuance ou un faible fond bleu.

On note, dans la lignée de cellules indiquée, que chacun des leucocytes représentés sur la figure 3, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles, provient des bandes qui en constituent le précurseur spécifique. La figure annexée n'indique pas de façon détaillée cette progression. Les promyélocytes sont indiqués comme étant des précurseurs des monocytes.

Les lymphocytes B et les lymphocytes T ont des noyaux essentiels ovales N-14 et N-16, respectivement. Chacun de ces noyaux, N-14 et N-16 se colore en un jaune semblable. Le cytoplasme C-14 et C-16 reste non coloré dans chaque cas. Dans ce cas également, une caractéristique du cytoplasme C-16 des lymphocytes T différencie nettement les lymphocytes T des lymphocytes B. Cette caractéristique consiste en la présence, dans le cytoplasme C-16, du petit amas de granules rouges 22.

On a également déjà noté dans le brevet principal une observation assez remarquable, selon laquelle tous les colorants cationiques quaternaires basiques qui manifestent une activité métachromatique pour les identifications et différenciations des leucocytes colorent également les monocytes.

Avec l'orangé basique 21, le noyau N-18, de forme générale ovale, des monocytes ne se colore pas. Cependant, le cytoplasme C-18 prend une couleur rose dans laquelle on peut discerner un nombre relativement faible de granules épars 24, de couleur cramoisie et rose, dont la nuance, la valeur et la couleur diffèrent suffisamment de la couleur "rose" du cytoplasme C-18 pour permettre une nette différenciation optique par rapport au cytoplasme C-18, qui a une coloration rose généralement semblable.

Comme également indiqué dans le brevet principal, la découverte du groupe des colorants inhabituels qui y est décrit simplifie l'identification et la numération des monocytes. La réaction classique de détermination d'une estérase non spécifique sensible à du fluorure, que l'on utilise en cytochimie pour identifier les monocytes exige souvent une heure, voire plus, pour s'achever et il faut des manipulations cytochimiques très précises pour le succès de cette détermination. Avec l'un quelconque des colorants décrits dans le brevet principal, on peut effectuer simplement, sans ajustements chimiques, en quelques minutes, la coloration d'une suspension, de fractions de sang entier ou de fractions séparées, et leur examen. Lorsque, dans le procédé de la présente invention, en utilisant seulement l'orangé basique 21, on colore les monocytes, cette coloration est instantanée pour le cytoplasme et pour les granules présents dans le cytoplasme.

Il convient de noter que les colorants métachromatiques peuvent finalement colorer les cellules à un point tel que des identifications soient perdues. Ainsi,

les différences de couleurs indiquées dans le présent exposé risquent d'être perdues, ou diminuées dans une large mesure, si des analyses ne sont pas rapidement effectuées. Comme une coloration pratique se produit rapidement, il n'est, cependant, pas nécessaire d'attendre pendant une période prolongée pour noter des différences maximales.

Dans l'art antérieur, l'identification et la différenciation des monocytes ont été réalisées par un traitement cytochimique complexe des cellules, qui demandait beaucoup de temps et impliquait une réaction de non-présence d'estérase, la préparation de cellules fixées, une hexazotation, un ajustement du pH et une coloration à l'aide de plusieurs colorants demandant environ 60 minutes pour réaliser ce qui peut l'être en moins d'une minute avec l'un quelconque des colorants du brevet principal, si on le désire, par un simple contact de l'échantillon de sang et du colorant avec un système aqueux. Avec le colorant spécifique du présent procédé décrit ici, il y a également une coloration préférentielle et instantanée du cytoplasme des monocytes.

On prépare, pour l'utilisation finale proposée et aux fins de la présente invention, le colorant remarquable en cause sous forme d'une solution aqueuse filtrée à la concentration d'environ 1 % de l'orangé basique 21 pur dans de l'eau distillée. La concentration du colorant n'est pas particulièrement fondamentale et peut faire l'objet de variations. On préfère que les solutions aqueuses soient utilisées pendant qu'elles sont fraîches et qu'elles ne comportent pas d'additif toxique. La présence de l'un quelconque des fixateurs classiques connus risque d'inhiber totalement la réaction métachromatique entre le colorant et le type spécifique ou la classe de leucocytes.

Le terme "vital" que l'on utilise ici constitue une caractéristique et une limitation importantes. Ce

terme s'applique à l'échantillon de sang d'origine et à des cellules vivantes fraîchement retirées d'un organisme vivant, ou d'un organisme fraîchement sacrifié, ou de leurs équivalents. Tel qu'il sert ici, ce terme entend exclure tous les "fixateurs", mais il permet l'utilisation des anti-coagulants (héparine, E.D.T.A., etc). Les cellules ou globules du sang peuvent également être retirés de la moelle des os, de l'urine et d'autres échantillons biologiques qui en contiennent, comme, par exemple, le tissu lymphatique et la rate.

Voici une illustration de la pratique générale de la présente invention :

On prépare une solution à 1 % dans l'eau distillée du colorant cationique quaternaire basique choisi, ici l'orangé basique 21. Si la pratique en indique la nécessité, on peut y mélanger, sous forme de solution, un ou plusieurs des colorants en cause. L'orangé basique 21 (courbe spectrale n° 7, figure 1) est spécifique.

Le colorant pur unique choisi et identifié ci-dessus (on peut également utiliser des combinaisons avec un plusieurs des colorants purs, comme décrit et illustré sur les tableaux I, II et III du brevet principal) est solubilisé pour produire une simple solution aqueuse du colorant. (L'étude des diverses proportions volumétriques de la solution aqueuse du colorant, et diverses forces ou concentrations des solutions aqueuses de colorants peut donner les conditions optimales pour diverses analyses cytologiques spécifiques). Un peu d'expérimentation peut conduire à des combinaisons spécifiques ayant des avantages particuliers. Cela est envisagé, mais sort du cadre purement inventif du présent exposé.

Les échantillons de sang peuvent provenir de diverses sources, mais l'on préfère des échantillons frais de sang veineux dont les érythrocytes ont été enlevés (par centrifugation, lyse hypotonique, sédimentation par gravité, sédimentation par gradient de densité,

etc), ou bien l'échantillon peut être un plasma enrichi en globules blancs par des techniques physico-chimiques connues. On évite la présence de fixateurs.

On préfère combiner le colorant aqueux et
5 l'échantillon de sang, tous deux fraîchement préparés ou obtenus, à la température du sang ou du corps normal (environ 36°-40°C) lorsque les analyses prévues l'indiquent. On obtient généralement une coloration plus rapide et plus nette aux températures élevées. L'orangé basique 21
10 ne semble pas présenter de sensibilité fondamentale à la température.

Les solutions du colorant et du sang se comportent bien lorsqu'on les combine selon un rapport volumétrique d'environ 1:4. On agite doucement le mélange durant
15 quelques secondes et l'on examine une goutte du mélange immédiatement sous forme d'un montage humide en utilisant une lamelle de verre de recouvrement, dans le champ d'un microscope optique ou dans un équipement automatisé de comptage différencié des leucocytes (ou d'établissement de la formule leucocytaire du sang), si on dispose
20 d'un tel équipement. D'autres façons de mettre en contact le colorant et les globules sanguins comprennent l'utilisation de milieux connus, comme par exemple la gélatine, des émulsions, etc, imprégnés du colorant à la concentration
25 d'environ 1 % du colorant. Une fixation de l'échantillon gêne gravement la co-action métachromatique, inhabituelle, du ou des colorants de la présente invention avec les leucocytes.

L'utilisation de l'orangé basique 21 permet
30 d'identifier et de distinguer les cellules suivantes les unes des autres, si elles sont présentes ensemble : myéloblastes, promyélocytes, métamyélocytes, myélocytes, bandes, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes B, lymphocytes T et monocytes. La description simplifiée
35 ci-dessus de la figure 3 permet de différencier ces cellules en vue d'une numération ou d'une autre étude.

Les exemples présentés ici à titre illustratif aideront l'homme du métier à apprécier les possibilités du nouveau procédé proposé. Parmi les divers avantages du procédé, on peut citer la numération des leucocytes totaux, la numération des types ou espèces de leucocytes, éventuellement le diagnostic de certaines maladies et notamment des leucémies, et la surveillance de monitoring de patients auxquels on applique divers traitements délicats, comme par exemple de la chimiothérapie, une thérapie par des radiations, l'ACTH, etc.

On sait que l'identification et la numération de tous les types ou espèces de leucocytes présentent souvent une importance fondamentale pour le diagnostic et le traitement des maladies.

Les exemples non limitatifs suivants sont destinés à illustrer la mise en pratique de l'invention et son utilité.

EXEMPLE 1

(Orangé basique n° 21 ; courbe spectrale n° 7, figure 1)

En se fondant sur la découverte initiale de la capacité inhabituelle de l'orangé basique n° 21 à colorer de manière métachromatique et de façon différentielle les globules blancs du sang, on s'est procuré un nombre très important de colorants appartenant aux séries des colorants méthiniques, polyméthiniques, quinoniques et/ou de la carbocyanine. Les colorants essayés en très grand nombre présentaient non seulement une similitude générale de structure, mais, comme dans le cas de l'orangé basique n° 22, et comme indiqué ci-dessus, les différences de structure semblent mineures et ne porter que sur quelques substituants.

L'étude a porté sur un nombre de colorants bien plus vaste que celui des colorants cités dans le brevet principal et l'on a trouvé que seul l'orangé basique n° 21 présente la métachromasie habituelle ici décrite.

On a obtenu sur des individus normaux, dans une série de tubes comportant de l'héparine, 50 ml de sang périphérique.

On a mélangé en double des tubes avec 10 ml d'une solution à 1 % du colorant orangé basique n° 21 dans de l'eau distillée à environ 37°C. On n'a pas observé un effet fondamental de la température sur ce colorant.

Lors de l'étude au microscope, on a décrit ici de façon plus précise les éosinophiles (décrits à l'origine comme ayant des granules bruns) comme ayant de gros granules de couleur orange dans le cytoplasme comportant un noyau lobulaire non coloré. On a observé que les basophiles ont une configuration géométrique semblable, mais les granules présentaient dans leur masse une couleur cramoisie brillant avec une faible nuance bleue. Le noyau a été également lobulaire et non coloré. Les monocytes ont été nettement différenciés du fait de leur noyau ovale non coloré et d'un cytoplasme rose contenant des granules cramoisis et roses. L'expression "non coloré" peut comprendre des colorations extrêmement pâles selon le temps qui s'est écoulé avant l'examen de lecture de la lame.

De façon tout-à-fait remarquable, la coloration différentielle des neutrophiles tant matures que immatures a été plus spécifique qu'avec n'importe quel colorant ayant jusqu'à présent fait l'objet d'observations au cours des études du présent inventeur ou cité dans l'art antérieur. Les neutrophiles matures ont été identifiables par voie spectrale du fait de la présence de plus gros granules, surtout de couleur jaune, dans le cytoplasme et du noyau lobé non coloré. On a observé que les neutrophiles immatures (voir figure 3) peuvent être identifiés par la présence de granules rouge orangé dans le cytoplasme et d'un noyau de forme générale ovale et qui n'est pas coloré.

EXEMPLE 2

On a préparé des suspensions de sang humain riche en cellules T et en cellules B à partir d'échantillons de 50 ml de sang périphérique obtenus à partir
5 d'individus normaux dans des tubes en "Vacutainer" contenant de l'héparine, par passage de fractions, enrichies, de Ficoll-Hypaque à travers des micro-colonnes de toile de "nylon". On a élué les colonnes, les suspensions riches en
10 cellules T et riches en cellules B, en utilisant des conditions réglées de température, avec différents tampons choisis, en opérant comme connu dans l'art antérieur.

On a soumis des fractions de ces suspensions récupérées à des analyses immunologiques en utilisant la formation de rosettes de cellules T pour déceler des
15 cellules T et la détection d'immunoglobulines de surface pour déceler des cellules B. On a incorporé une goutte d'une solution aqueuse à 1 % du colorant orangé basique 21 à 5 gouttes de la suspension recueillie dans des tubes à
20 essais séparés. Chaque tube a contenu environ 2×10^6 lymphocytes. On a observé au microscope que les lymphocytes, identifiés comme étant des cellules T du fait de la formation de rosettes de cellules T, contiennent de petits groupes ou amas de 5 à 10 granules rouges ou davantage. Les lymphocytes identifiés par des méthodes immunologiques
25 comme étant des cellules B n'ont présenté qu'un rare granule coloré en rouge dans le cytoplasme ; la plupart des lymphocytes B ne comportaient pas de granules rouges présents dans le cytoplasme. Le noyau était ovale et coloré en jaune dans les cellules T aussi bien que dans
30 les cellules B. Le bleu de rhodanile et la carbocyanine K-5 (colorants cités dans le brevet principal) ont également coloré de façon générale les lymphocytes, mais la couleur obtenue pour les granules n'a pas été aussi vive que dans le cas de l'utilisation de l'orangé basique 21 comme
35 colorant.

L'utilisation de l'orangé basique 21 constitue, par rapport à la méthodologie actuellement connue, un

procédé nouveau et rapide pour identifier, différencier et compter les lymphocytes T et B et des cellules. Les procédés actuellement connus impliquent l'utilisation de réactifs biologiques instables (cellules de moutons),
5 exigent des techniques radio-isotopiques onéreuses et demandant beaucoup de temps, exigent la maîtrise de nombreuses variables comme la température, le pH des milieux d'incubation, etc, ce qui ne semble plus nécessaire .

EXEMPLE 3

10 Les échantillons du sang périphériques de personnes normales en bonne santé ne présentent généralement pas des leucocytes immatures de la série myéloïde comprenant des promyélocytes, des myélocytes et des méta-
15 myélocytes. On trouve ces derniers types de cellules dans certains états malades, par exemple l'invasion de la moelle des os par un cancer, une réaction "leucémoïde", telle qu'on en trouve en cas d'infection grave, une leucémie granulocytaire chronique, etc. On a observé au
20 cours d'une série d'essais que l'orangé basique 21 confère à des leucocytes de malades des couleurs qui diffèrent de celles des leucocytes normaux. Ainsi, on a observé, par comparaison avec des échantillons de sang périphérique de personnes normales et en bonne santé, ou échantillons
25 étalons, que les granules des éosinophiles se colorent en orangé foncé, alors que les granules des éosinophiles des personnes présentant une infection aiguë se colorent en un jaune doré.

EXEMPLE 4

30 Une femme âgée de 48 ans, présentant un cancer de la poitrine à son état terminal, a développé de la septicémie et une forte fièvre peu avant de mourir. A ce moment crucial, sa numération de globules blancs s'est élevée à 45 000 par mm^3 . En utilisant la coloration classique de Wright, il a été établi que 60 % des
35 leucocytes du sang périphérique étaient des bandes présentant un noyau caractéristique non segmenté.

Des échantillons du sang de la patiente ont été colorés à l'aide d'une solution aqueuse à 1 % d'orangé basique 21, comme colorant vital utilisé sans fixateur.

5 On a identifié des bandes par la présence constante d'un petit amas de granules (primaires) se colorant en rouge parmi un plus grand nombre de granules (secondaires) plus gros qui se sont colorés, de façon métachromatique, en jaune, ainsi que le noyau typique
10 non segmenté.

Il a ainsi été possible d'effectuer des opérations positives d'identification, de différenciation et de numération des formes de bandes en se fondant sur la maturation de leurs cytoplasmes et sur la diffé-
15 rence de couleur entre leurs granules primaires et secondaires plutôt que de se fonder uniquement sur la dimension et la forme du noyau.

EXEMPLE 5

Cinq patients, connus pour présenter une leucémie lymphocytaire chronique non traitée, ont été des donneurs
20 d'échantillons de sang veineux périphérique.

En utilisant des marqueurs immunologiques classiques (rosette des cellules T, marqueurs de Ig G de surface), on a établi que toutes ces leucémies
25 étaient du type à cellules B.

On a mélangé cinq gouttes, constituant des fractions de chaque échantillon provenant d'un donneur, avec une goutte d'une solution aqueuse fraîchement préparée, filtrée à 1 % d'orangé basique 21 dans la série des
30 tubes à essai. Les lames observées avec un montage humide au microscope optique ont montré qu'aucune des cellules ne contenant un amas de granules rouges dans le cytoplasme, comme cela est caractéristique dans le cas des lymphocytes T ou cellules T. Toutes les cellules
35 malades se sont colorées en jaune dans le noyau, comme des lymphocytes B ou les cellules B normaux.

Ces résultats d'essais ont confirmé, sans long retard ni opérations cytologiques fastidieuses, le premier résultat de l'absence de cellules T et ont renforcé la théorie actuelle selon laquelle la leucémie lymphocytaire chronique est une maladie associée aux cellules B.

EXEMPLE 6

A son admission à l'hôpital, un homme de 62 ans, présentait une température de 39,4°C, des frissons et de la fièvre. Des examens aux rayons X ont montré une pneumonie étendue dans le lobe inférieur droit du poumon. Des cultures du sang ont donné un résultat positif pour Klebsiella pneumoniae. En utilisant une coloration classique de Wright, avant traitement par des antibiotiques, on a dénombré 36000 globules blancs du sang par mm³. Le sang a contenu de nombreux promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes ainsi que des neutrophiles matures.

Des études chromosomiques ont montré que le patient présentait une réaction "leucémoïde" et non pas une leucémie.

On a obtenu un échantillon de sang périphérique additionné d'héparine et on l'a soumis à des analyses vitales, sans fixateur, en utilisant cinq gouttes de sang avec une goutte d'une solution aqueuse fraîchement préparée à 1 % d'orangé basique 21. On a agité l'échantillon coloré et on l'a immédiatement examiné sous forme de montage humide. On a distingué les promyélocytes du fait que les granules primaires ne sont colorés en rouge orangé vif ou en cramoisi à magenta. Les myélocytes ont présenté une plus faible proportion de granules jaunes que de granules rouges orangés dans le cytoplasme, en comparaison des métamyélocytes, les granules rouges (lysosomes) des derniers ont été regroupés en amas dans la petite partie terminale du cytoplasme en donnant un ensemble présentant deux couleurs principales. Les neutrophiles ont été identifiés par la présence d'un cytoplasme comportant surtout des granules secondaires jaunes. Les résultats ont montré que l'orangé basique 21 a permis une différenciation instantanée des

divers stades reconnus de maturation de cellules granulocytiques et a permis de les identifier dans des préparations de sang ou de fluides provenant de tissus.

Dans la description et les exemples ci-dessus, on a un peu insisté sur l'importance que les progrès ici décrits peuvent avoir lorsqu'on les applique à des équipements automatisés d'établissement de la formule leucocytaire du sang. On ne connaît pas actuellement d'équipement capable de tirer avantage, sans modification de cet équipement, du procédé ici décrit et qui a été utilisé manuellement. L'homme du métier et ceux qui travaillent dans le domaine de la technologie médicale savent bien l'importance d'une détermination précise et rapide des diverses numérations et différenciations de leucocytes, ou de l'établissement d'une formule leucocytaire, à diverses fins. Il a été estimé qu'aux Etats-Unis d'Amérique, on effectue chaque jour un demi-million de déterminations des formules leucocytaires du sang, en appliquant dans la plupart des cas des techniques manuelles, ce qui coûte plus de 750 millions de dollars (4,5 milliards de francs) par an.

De telles numérations, manuelles ou automatisées, exigent fondamentalement que l'on puisse identifier, différencier par voie spectrale et compter les cellules, notamment pour faciliter un diagnostic en médecine. Il n'est pas douteux que le progrès ci-dessus dans ces domaines fondamentaux va donner naissance à des progrès dans le domaine d'un équipement auxiliaire automatisé, comme indiqué ici.

Les numérations sanguines, dont il est ici question, constituent, qu'elles soient manuelles ou automatisées, des aides très importantes, voire vitales, pour l'examen et la détermination de la nature d'une maladie. On peut ainsi mieux déceler, et donc mieux traiter, des fièvres d'origine inexpliquée, dues à une infection virale, ou non pyogène, à un appendice impliquant une formation de pus, à la vésicule biliaire ou aux trompes de Fallope;

on peut mieux établir un pronostic pour des patients présentant diverses maladies à divers stades ; des tumeurs malignes, ce qui comprend la maladie de Hodgkins ; une maladie pulmonaire ; on peut surveiller le traitement des patients par des stéroïdes du type des hormones corticosurrénales (corticothérapie), ainsi que divers genres de leucémies aiguës et chroniques ; on peut établir une différence, lors du diagnostic, entre un infarctus aseptique de l'os et une ostéomyélite.

Un dénombrement précis des leucocytes, leur analyse et leur étude cytologique peuvent ainsi contribuer au diagnostic, au pronostic et au traitement des états maladiés ci-dessus, ainsi que des infections bactériennes et aussi contribuer à l'étude de nombreuses autres questions médicales.

Tel qu'il sert ici, le terme "métachromatique" concerne non seulement la qualité particulière et inhabituelle des colorants ici décrits, mais aussi la qualité des divers constituants, par exemple le noyau et le cytoplasme, de chaque type ou espèce individuel de leucocyte qui coréagissent de manière métachromatique avec quelque chose, à la manière d'une synergie, pour produire la différence de réponse spectrale permettant les progrès ici décrits en cytochimie. Essentiellement, chaque type ou espèce de globules blancs du sang sorbe (ou ne sorbe pas) un seul colorant métachromatique d'une façon inhabituelle ou remarquable, de sorte que chaque cellule ayant sorbé un colorant donne par réflexion un spectre lumineux individuel et différent.

On sait bien que certains leucocytes granulaires présentent des affinités différentes pour divers colorants, c'est-à-dire que les basophiles présentent de l'affinité pour les colorants basiques, les éosinophiles présentent de l'affinité pour des colorants acides et les neutrophiles ne se colorent pas intensément sous l'effet des colorants acides ou basiques. L'art antérieur ne suggère cependant

pas l'existence de caractéristiques morphologiques ou d'un comportement chimique permettant à l'orangé basique 21 de présenter spécifiquement des distinctions aussi nettes que celles que l'on trouve maintenant entre les 5 lymphocytes T et les lymphocytes B et permettant la distinction inhabituelle des bandes.

Cela semble d'autant plus étrange lorsqu'on constate que l'orangé basique 22, dont la structure chimique ne varie que par des différences de position 10 de deux groupes secondaires, comme étudié ci-dessus, est totalement inefficace aux fins ici visées.

L'identification, la différenciation et la numération des monocytes ont une grande importance pour un diagnostic. La présence d'un nombre accru de monocytes 15 dans le sang peut indiquer l'existence d'une tuberculose active, d'une septicémie ou d'un empoisonnement du sang et des lymphomes comme dans le cas d'un diagnostic de la maladie de Hodgkins. La présence d'un nombre accru de monocytes dans le sang de personnes se relevant d'une 20 anémie hypoplastique ou aplastique peut appeler un pronostic favorable pour le patient. Des analyses rapides et précises de monocytes au microscope, par le procédé de l'invention, favorisent une application étendue d'une technique intéressante.

25 La détection, l'identification et la numération des leucocytes polymorphonucléaires (neutrophiles) constituent des paramètres très importants, voire critiques, dans toutes les évaluations du sang. Ils sont particulièrement importants dans le diagnostic d'infections aiguës 30 comme la pneumonie ou la péritonite, au cours desquels le nombre des neutrophiles augmente. Ils sont importants aussi pour la surveillance de monitoring de patients soumis à une chimiothérapie et à une thérapie par des rayonnements. Une diminution des numérations peut se produire 35 dans le cas d'une infection écrasante, comme manifestation de la toxicité des drogues, en cas d'hyperactivité de la rate et au cours de la leucémie aiguë.

Si le nombre absolu des neutrophiles tombe au-dessous de 1000 par mm^3 , le risque d'infection augmente très fortement. Le colorant spécifique de la présente invention colore instantanément les granules ou lysosomes constituant une structure caractéristique d'identification des leucocytes polymorphonucléaires ou neutrophiles.

Les éosinophiles comme les basophiles sont impliqués dans des réactions allergiques. Les lymphocytes sont impliqués dans une inflammation et à un plus grand degré dans des réactions immunitaires et dans des réponses à des antigènes (corps étrangers). Les éosinophiles sont instantanément identifiés par la présence des grands granules de couleur orange dans le cytoplasme et par la configuration lobulaire du noyau non coloré.

La numération des éosinophiles sert à surveiller l'administration médicale de l'hormone corticotrope ACTH lors du traitement d'états cliniques. Les procédés antérieurs ont introduit des artéfacts donnant lieu à des confusions et des formes indéfinies ressemblant à s'y méprendre aux éosinophiles. La précision de la numération des globules sanguins diminue, dans l'art antérieur, à mesure que le temps s'écoule entre la préparation d'un échantillon de sang et l'achèvement de la numération. On utilise alors essentiellement de multiples colorants. Il faut souvent effectuer des colorations à l'aide de colorants acides et basiques. Les colorants utilisés dans l'art antérieur tendent à se séparer par cristallisation de leur solution au repos.

On sait que les lymphocytes, spécifiquement identifiables à titre de classe, à l'aide du bleu borrel, sont liés à une inflammation et à des réactions immunitaires. Leur nombre augmente dans le sang des personnes présentant de la leucémie lymphatique chronique et de personnes ayant la coqueluche. Leur nombre peut diminuer chez des patients soumis à une chimiothérapie et à une radiothérapie, chez les patients présentant un lymphome et dans le cas de divers types de déficiences immunologiques héréditaires.

Les basophiles ont un cytoplasme qui contient de gros granules riches en substance cationique comme l'héparine, la sétotonine et l'histamine. Ils sont impliqués, par exemple, dans les réactions allergiques.

5 Le principal progrès de la présente invention réside dans la découverte d'un colorant, actuellement remarquable, qui colore de façon différentielle les lymphocytes (qui n'étaient antérieurement colorés que sous forme d'une classe par le bleu borrel) à de plus faibles
10 températures et qui peut servir sous une seule forme pure pour une identification, aussi bien manuelle qu'automatique, et pour une étude de chaque espèce ou type indiqué. Il va de soi que l'on peut trouver des avantages potentiels à utiliser des combinaisons des colorants décrits dans
15 le brevet principal avec l'orangé basique 21, dont l'utilisation spécifique est ici décrite.

La différenciation des cellules T et des cellules B, au cours d'études effectuées selon l'art antérieur, implique des préparations et modes opératoires biochimiques
20 plus complexes, comportant la détermination ou la mise en oeuvre de : 1) de la phosphatase acide (enzyme) ; 2) une estérase non spécifique ; 3) des fragments d'immunoglobulines humaines (Ig G) ; 4) des colorants fluorescents et 5) des préparations de globules rouges de sang de mouton ayant une
25 vie utile d'environ 14 jours, ce qui constitue la base de la formation des rosettes pour l'identification des cellules T et dépend de la température.

On trouve les lymphocytes T dans 60 à 80 % du sang périphérique et dans 85 à 90 % du sang du canal
30 thoracique. On sait que ces cellules sont liées à des rejets d'allogreffes, et l'examen des cellules T et des cellules B est important en immunologie et en pathologie. Les cellules B sont moins nombreuses et se trouvent à raison de 10 à 30 % dans le centre germinatif et les
35 cordons médullaires.

Les toxicomanes et les personnes manifestant de l'accoutumance à certaines drogues ou médicaments présentent une diminution importante du nombre des cellules T.

Les troubles immunologiques congénitaux sont, dans leur très grande majorité, liés aux systèmes des cellules T et des cellules B. On sait également que les maladies néoplastiques impliquent le système immunogénétique et il est admis que ces patients présentent des anomalies des systèmes générateurs des lymphocytes T et des lymphocytes B. Les lymphomes d'adultes ont le plus souvent pour origine des cellules B. D'autre part, les lymphomes des enfants comportent des cellules T de marquage, que l'on pense liées au thymus, plus actif au début de l'enfance.

La leucémie lymphocytaire chronique est une maladie apparentée aux cellules B ; un leucémique présente des cellules B et ne comporte pas d'amas de cellules T. Ce bref exposé sommaire permet de voir la grande portée et l'importance d'une identification, d'une comparaison et d'une numération faciles et rapides de ces cellules.

Dans tous les cas, l'expression "observation au microscope" est destinée à comprendre l'éclairage par la lumière blanche, qui sert de façon classique en microscopie clinique. Une numération différentielle automatisée des leucocytes (ou l'établissement automatisé d'une formule leucocytaire du sang) est devenue actuellement possible avec un microscope normalement éclairé à la lumière blanche, mais, pour autant qu'on le sache, il n'existe actuellement dans le commerce aucun équipement pouvant directement servir à cet effet. Le procédé de la présente invention contribue à permettre un développement couronné de succès, d'un équipement automatisé de numération différentielle des leucocytes (ou d'établissement d'une formule leucocytaire du sang) lié à une calculatrice ou un ordinateur, et l'invention résoud de nombreux problèmes qui ont retardé cette mise au point d'un équipement automatisé.

On pense que le terme "métachromatique" a été tout d'abord utilisé par Ehrlich (1897) pour décrire une coloration qui change de couleur apparente lors de la sorption du colorant par certaines cellules. Le colorant est dit présenter de la métachromasie, et l'on a observé qu'il s'agit d'une propriété caractérisant un nombre relativement faible de colorants purs, surtout des colorants cationiques basiques comprenant des méthines, des polyméthines et des carbocyanines, qui colorent des éléments tissulaires en une couleur différente. La métachromasie se définit également comme supposant l'émission, par des substances différentes, de spectres de couleurs différentes, lorsque ces substances sont colorées par le même colorant. En cytologie, des granules ou autres éléments cellulaires métachromatiques sont ceux qui prennent une couleur différente de celle du colorant servant à les colorer.

Deux facteurs sont impliqués de manière inhérente dans l'exposé ci-dessus de la signification des termes "métachromatique" et "métachromasie". L'un est la cellule biologique (et ses parties spécialisées), que l'on appelle "métachromatique" ou "chromotrope", et il s'agit alors d'une qualité ou d'une caractéristique de l'échantillon de cellules biologiques, et l'autre concerne la qualité du colorant. Très peu de colorants possèdent ce qui constitue une qualité essentielle pour stimuler une des structures à l'intérieur d'une cellule et leur faire manifester de la métachromasie. Conn (9e édition) indique que "des colorants purs montrant cette réaction sont très peu nombreux". Il existe peu de rapports indiquant que le phénomène a impliqué jusqu'à présent plus de deux spectres colorés distincts. Dans un cas, on a signalé "une légère coloration en bleu-vert clair du noyau, avec une métachromasie violette du cartilage". Cependant, les colorants étant normalement appliqués alors à des tissus fixés, dont la nature chimique et physique est altérée par les modes opératoires usuels de préparation à la coloration, une

coopération essentielle entre les caractéristiques des structures biologiques naturelles au sein d'un échantillon de cellules risque d'être ainsi modifiée et d'être rendue non sensible à ce qui pourrait, sinon, provoquer une
5 réaction, de sorte qu'une sorption du colorant ne se produit alors pas.

On connaît bien les colorants fluorescents. Au cours de la fluorescence, une plus grande énergie lumineuse est émise, sur d'étroites fréquences choisies, que l'énergie
10 absorbée dans ces fréquences choisies, bien que l'énergie totale de la lumière réfléchie ne soit pas supérieure à celle de la lumière totale absorbée. De la métachromasie fluorescente est connue (on peut citer par exemple certains colorants de la classe comportant comme chromophore de
15 l'acridine). Cependant, cette qualité de métachromasie n'entre pas dans le cadre du terme "metachromasie", tel qu'on l'utilise ici. Ce terme est utilisé ici en accord avec le sens que l'on trouve pour ce terme dans "Conn" (9e édition) et dans "Synthetic Dyes in Biology, Medicine
20 and Chemistry" (colorants synthétiques en biologie, médecine et chimie) de Gurr et dans "Rational Use of Dyes in Biology" (utilisation rationnelle des colorants en biologie) de Gurr où l'on ne trouve aucune référence à de la
"métachromasie fluorescente".

25 Cependant, des colorants utiles aux fins de la présente invention peuvent présenter un peu de fluorescence, comme une fluorescence en solution, mais ils ne dépendent pas de la qualité de métachromasie par fluorescence
30 "pour pouvoir être utiles aux fins de la présente invention. Tel qu'il sert ici, le terme "métachromasie" est indépendant de la réponse en fluorescence à n'importe quelle longueur d'onde donnée de la lumière.

Des groupes chromophores spécifiques ont servi, comme dans l'ouvrage "Color Index" pour la classification
35 des colorants. Les colorants qui s'avèrent utiles aux fins du brevet principal et éventuellement de la présente

invention ne constituent qu'un très petit nombre de colorants dans les classes identifiées. Les colorants les plus intéressants et les plus prometteurs sont ceux des séries méthiniques, polyméthiniques, de la quinoléine et de la carbocyanine, dans lesquels le groupe chromophore ainsi identifié constitue un pont entre d'autres groupes chromophores de la classe des colorants cationiques. Souvent, par exemple, on trouve un groupe méthine ou polyméthine, constituant un pont entre un ou plusieurs chromophores portant des noyaux quinoléine.

On a également trouvé des exemples représentatifs utiles dans la large classe identifiée en pratique comme étant des aryl méthanes, parmi lesquels l'un des quelques colorants utiles choisis aux fins de la présente invention est un triamino-triaryl méthane (violet de Hofman) et un autre est un phényl naphtyl méthane (bleu de nuit). Ce sont les deux seuls qui se sont avérés pouvoir servir, parmi un très grand nombre de colorants de cette classe générale ayant été soumis à des essais. D'autres classes connues pour ne comporter qu'un petit nombre d'espèces pouvant fonctionner bien, comprennent des oxazines, des thiazines et des indamines. Aucune des autres classes de groupes chromophores énumérés dans le système de classification du Color Index n'a, jusqu'à présent au cours des recherches du demandeur, donné d'espèces pouvant bien fonctionner dans le cas présent.

Une large classe de colorants basiques englobant les colorants métachromatiques de la présente invention comprend ceux dans lesquels le groupe auxochrome est un groupe amino primaire, secondaire ou tertiaire. Un atome d'azote au moins joue le rôle d'atome d'azote quaternaire et, par addition d'un anion incolore, le plus souvent, un hydracide halogéné, il peut former un sel. Comme les hydracides halogénés sont des acides relativement forts en comparaison de la base immonium, les composés obtenus sont le plus souvent faiblement acides ou présen-

tent un pH acide. Le groupe chromophore organique est un cation, portant une charge positive, et l'ion halogène constitue l'anion ou charge négative.

Après la découverte de l'intérêt pouvant être
5 attaché à l'orangé basique 21, qui est un colorant polyméthinique, pour la classification des globules blancs du sang, des échantillons d'autres colorants orangés basiques, identifiés dans le Color Index par les numéros 22, 27, 42, 44 et 46, ont été trouvés et soumis à des essais de
10 métachromasie. Ces colorants étaient indiqués comme se situant dans la classe des polyméthines. On a également essayé les orangés basiques 24, 25, 26 et 28. Aucun de ces colorants n'était une polyméthine. Parmi l'ensemble des orangés basiques essayés, ce qui comprend des orangés
15 basiques polyméthiniques et méthiniques, seul l'orangé basique 21 s'est avéré être un colorant utile aux fins de la présente invention.

Comme, dans le brevet principal, il a été établi
20 que le rouge basique 13 et le violet basique 16, de la classe des polyméthiniques, présentent un intérêt pour l'identification par métachromasie des globules sanguins, la recherche a été poussée en vue de couvrir des rouges et violets méthiniques et polyméthiniques du Color Index, identifiés de manière semblable et disponibles. Lors des
25 essais, il a été trouvé que les rouges basiques n° 14, 15, 27, 37, 68 et 102 n'ont pas la qualité de métachromasie essentielle pour colorer des monocytes et/ou d'autres leucocytes. Il a cependant été établi que les rouges basiques n° 35, 36 et 49 (qui sont tous des polyméthines)
30 sont utiles pour la coloration métachromatique différentielle des globules blancs du sang, domaine auquel s'est intéressé le brevet principal.

On a trouvé que les colorants violets basiques
n° 7, 15, 16, 39 et 40 (qui sont tous, également, des
35 polyméthines) sont utiles et peuvent servir ici. Cependant, le violet basique 14, qui n'est pas classé à titre de

polyméthine dans le Color Index, n'a pas développé de métachromasie de coloration des globules blancs du sang, comme le violet basique 16.

5 Bien que le Color Index identifie tous les colorants indiqués ci-dessus, on se fondera sur leur courbe spectrale comme arbitre final pour l'identification de tous les colorants cités ici, dans la mesure où ces courbes sont disponibles pour les colorants précités ayant les numéros indiqués du Color Index.

10 Comme dans le brevet principal, on entend désigner par les expressions "analyse vitale" des leucocytes du sang, ou "coloration vitale des cellules", la coloration des leucocytes, sans les fixer, de manière que lesdits leucocytes restent encore vivants pendant la coloration et pendant leur examen au microscope.

15 On peut également noter que le procédé de la présente invention peut servir ou contribuer à l'analyse rapide du sang de donneurs éventuels de sang, en vue de transfusions : on peut ainsi examiner rapidement si le sang du candidat donneur est "sain" et utilisable dans le ou les cas en cause.

20 Il va de soi que, sans sortir du cadre de l'invention, de nombreuses modifications peuvent être apportées au procédé décrit et représenté.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'analyse vital, au microscope, des leucocytes et lymphocytes d'un sang humain normal ou pathologique, ce qui comprend des lymphoblastes
5 leucémiques potentiellement présents dans un échantillon de sang provenant d'un donneur, dans un environnement aqueux sans fixateur, selon l'une des revendications 1 et 2 du brevet principal, procédé caractérisé en ce qu'on expose cet échantillon de sang, ou une fraction dudit échantillon, à l'action de l'orangé basi-
10 que 21 (courbe spectrale N° 7), de sorte que chaque espèce ou type de globules présents dans ledit échantillon et qui se colore, sorbe le colorant de manière métachromatique et se différencie (a) par la présence ou l'absence de couleur et par la forme du noyau des globules ou cellules et (b)
15 par le nombre relatif, la dimension, l'agencement et la forme et la ou les couleurs des granules présents dans le cytoplasme.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les cellules ou globules du sang humain se trouvant dans
20 un échantillon provenant d'un donneur comprennent une ou plusieurs des espèces ou un ou plusieurs des types suivants de cellules : myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, bandes, neutrophiles, éosino-
philes, basophiles, cellules B, cellules T et monocytes,
25 le procédé étant caractérisé en ce qu'il permet d'identifier par voie optique ces types ou espèces l'un par rapport à l'autre.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les lymphocytes normaux ou pathologiques présentant un
30 intérêt particulier sont des cellules B et des cellules T, le procédé étant caractérisé en ce qu'il permet d'identifier chaque type individuel de cellules et permet de les compter dans le cadre de l'analyse vitale des cellules du sang.

4. Procédé d'analyse, destiné à être un élément
35 d'appréciation dans l'examen d'un patient et, éventuellement ou en variante, à permettre de surveiller le traite-

ment d'une maladie, caractérisé en ce qu'on soumet une fraction d'un échantillon de sang provenant d'un patient, échantillon à l'état ne comportant pas de fixateur, à une coloration vitale dans un environnement aqueux à l'aide du colorant orangé basique 21 (courbe spectrale n° 7) ; on compare, sous le microscope, les leucocytes du donneur ainsi colorés ou non colorés, avec un échantillon de sang connu, provenant d'une personne non malade, qui a été préparé de façon semblable et constitue un étalon de base pour la comparaison ; et l'on note les différences, par rapport à cet étalon, des propriétés tinctoriales des granules du cytoplasme et du noyau présent dans l'échantillon analysé, ce qui permet de déterminer la présence ou l'absence de modification d'un ou plusieurs des leucocytes de l'échantillon, par rapport à l'étalon, dans la fraction d'échantillon de sang provenant du donneur, en vue, par exemple, de déterminer la présence ou l'absence d'une maladie affectant un ou plusieurs desdits leucocytes.

5. Procédé pour étudier une maladie humaine, par analyses et comparaisons, au microscope, d'échantillons de sang contenant des leucocytes encore vivants, sans fixateur, provenant d'un donneur, procédé caractérisé en ce qu'on soumet une fraction de l'échantillon de sang de ce donneur à une coloration à l'aide de l'orangé basique n° 21 (courbe spectrale n° 7) et en ce qu'on identifie, compte et compare chaque espèce de leucocytes intéressantes pour l'étude en cause et présente dans ledit échantillon qui a subi une coloration métachromatique et différentielle et en ce qu'on compare, avec des échantillons étalons témoins provenant de personnes non malades, pour déterminer la présence, l'absence ou des variations de couleurs et de formes du noyau et déterminer aussi le nombre relatif, la dimension, l'agencement ou la forme et la ou les couleurs et les variations ou les proportions de couleurs des granules du cytoplasme.

6. Procédé d'analyse vitale, au microscope, d'un sang humain normal ou pathologique, selon lequel on fait,

sélectivement, apparaître par voie spectrale les lymphocytes, ou lymphoblastes leucémiques potentiellement présents, ce procédé étant caractérisé en ce qu'on met au moins une fraction d'un échantillon de sang humain encore vivant en contact, à l'état sans fixateur, avec un environnement aqueux comportant au moins un colorant cationique quaternaire basique ayant la combinaison chromophore essentielle de structure et de groupes présents comme dans l'orangé basique n° 21 (courbe spectrale n° 7), de manière à différencier métachromatiquement les espèces individuelles ou types individuels de ces cellules les uns des autres, ce qui permet de classer et de compter les types reconnus présents dans l'échantillon soumis à l'analyse.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on identifie et compte, par des observations humaines, les lymphocytes et lymphoblastes différenciés par voie métachromatique.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on identifie et compte, à l'aide d'un équipement ou dispositif physique répondant aux spectres lumineux, les lymphocytes et lymphoblastes différenciés par voie métachromatique.

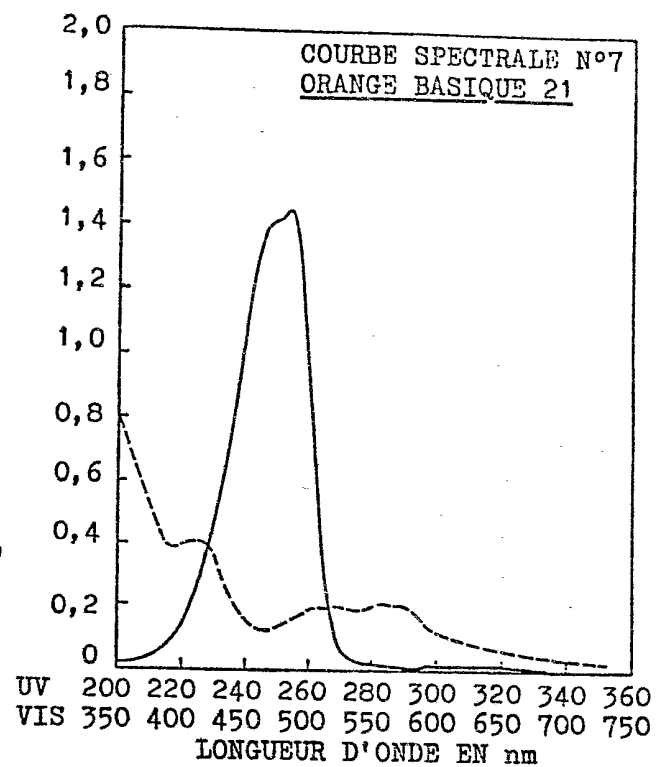
9. Procédé d'analyse, au microscope, du sang humain encore vivant, permettant une différenciation optique, une comparaison et une numération des lymphocytes T et des lymphocytes B par coloration métachromatique d'au moins une fraction d'un échantillon de sang humain sans fixateur, procédé caractérisé en ce qu'on effectue cette coloration par mise en contact de la fraction ou de l'échantillon, dans un environnement aqueux, avec le colorant orangé basique 21 (courbe spectrale n° 7) et en ce qu'on différencie les cellules T présentes, par rapport aux cellules B, par la présence d'un amas de granules rouges dans le cytoplasme, par ailleurs non coloré, des cellules T et par l'absence de cet amas de granules rouges dans le cas du cytoplasme des cellules B

présentes, le noyau des cellules T et des cellules B étant coloré en jaune.

10. Procédé d'analyse, au microscope, d'un sang humain encore vivant, permettant une différenciation
5 optique, une numération et une comparaison de bandes présentes, par coloration métachromatique d'au moins une fraction d'un échantillon de sang humain encore vivant, sans fixateur, procédé caractérisé en ce qu'on met cette
10 fraction en contact, dans un environnement aqueux, avec du colorant orangé basique n° 21 (courbe spectrale n° 7) et en ce qu'on différencie les cellules de bandes des autres leucocytes potentiellement présents dans cet échantillon du fait de la présence, dans le cas des bandes, d'un amas relativement faible de granules, de
15 couleur rouge orangé, situé à part dans le champ cytoplasmique consistant en un grand nombre de granules jaunes autour d'un noyau non coloré.

11. Procédé d'analyse, au microscope, d'un sang humain encore vivant, caractérisé en ce qu'on
20 effectue une différenciation optique, une numération et une comparaison de chaque cellule individuelle d'une série myéloïde granulocytaire comprenant, lorsque la série est complète, des promyélocytes, des myélocytes, des métamyélocytes, des bandes et des neutrophiles,
25 par coloration métachromatique d'au moins une fraction d'un échantillon de sang humain encore vivant, sans fixateur, par mise en contact de cette fraction, dans un environnement aqueux, avec le colorant orangé basique n° 21 (courbe spectrale n° 7) ; on différencie ainsi les
30 promyélocytes par la présence de granules primaires, de couleur surtout rouge orangé, dans le cytoplasme, les myélocytes par la présence d'un mélange formé surtout de granules primaires de couleur rouge orangé dans un croissant plus petit et une masse plus faible de granules
35 secondaires jaunes dans un croissant plus épais du cytoplasme ; des métamyélocytes par une plus petite masse de granules primaires de couleur rouge orangé dans le petit croissant et de granules secondaires jaunes

dans une masse proportionnellement plus grosse et plus épaisse d'une seconde partie du croissant constituant le cytoplasme ; les bandes par un amas relativement petit de granules primaires de couleur rouge orangé dans un
5 champ dominant de granules secondaires jaunes constituant le cytoplasme, et les neutrophiles par le fait que la quasi-totalité des granules du cytoplasme sont jaunes, chaque membre de la série ci-dessus comportant une surface ou un volume de noyaux qui diminue apparemment en fonction
10 de la surface ou du volume de la cellule et reste sensiblement non coloré, les trois premiers membres de la série ayant une dimension globale de cellules (surface ou volume) généralement supérieure à celle des deux autres membres de la série.

FIG.1FIG.2