

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 865 279

②① N° d'enregistrement national : **04 00492**

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/68

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 20.01.04.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 22.07.05 Bulletin 05/29.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : BIOMERIEUX Société anonyme — FR, AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS AFSSA — FR, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS — FR et UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I — FR.

⑦② Inventeur(s) : BENCSIK REYNIER ANNA, COLEMAN ANTHONY WILLIAM, DA SILVA ERIC, DUPIN MARILYNE, LECLERE EDWIGE, MARTIN AMBROISE, MOUSSA ALY, PERRON HERVE et RONZON FREDERIC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ PROCÉDE DE DETECTION DE LA PRP UTILISANT UNE MOLECULE AYANT AU MOINS UNE CHARGE POSITIVE ET/OU AU MOINS UNE LIAISON OSIDIQUE ET UN LIGAND AUTRE QU'UN LIGAND PROTEIQUE.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de détection de la PrP dans un échantillon biologique d'origine humaine ou animale susceptible de contenir de ladite PrP, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique.

FR 2 865 279 - A1



La présente invention concerne le domaine des maladies à prion, et en particulier un procédé de détection des formes pathologiques du prion responsables de ces maladies.

La protéine prion native ou normale, désignée PrP ou Pr^c pour la protéine prion cellulaire, est une glycoprotéine largement exprimée dans les cellules lymphoïdes et neuronales des mammifères.

Des changements conformationnels de PrP^c conduisent à l'apparition et à la propagation de la protéine pathologique PrP^{sc} qui est résistante à la protéinase K. Cette protéine pathologique peut être appelée PrP^{sc} ou PrP^{res} indifféremment. L'accumulation de PrP^{sc} dans les organes des mammifères est à l'origine de nombreuses maladies, appelées maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), et notamment de la tremblante des petits ruminants, de la maladie cachectisante chronique (ou chronic wasting disease « CWD ») de l'élan et de l'antilope, de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), et de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC) chez l'homme.

Le développement de la maladie chez l'hôte infecté se traduit par une accumulation de la protéine pathologique PrP^{sc}. La migration de la protéine pathologique et son accumulation dans le cerveau conduit à une altération irréversible des cellules du cerveau.

L'apparition tardive après une période d'incubation de 2 à 6 ans et le lent développement des symptômes chez le bétail infecté par l'ESB a considérablement ralenti le développement de modèles épidémiologiques. L'ESB est transmissible par ingestion à l'homme et a conduit à l'apparition d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jacob (vMCJ) chez l'homme.

La détection de la protéine pathologique PrP^{sc} est difficile chez les animaux infectés asymptomatiques avant le développement de la maladie et surtout dans les liquides physiologiques, tels que le sang et l'urine, chez les animaux malades. Il est à présent établi que la PrP^{sc} présente chez les animaux destinés à l'alimentation humaine se transmet à l'homme lors de l'ingestion des tissus infectés. Un objectif majeur de santé publique est donc d'éviter cette transmission en détectant la présence de la PrP^{sc} :

- chez des animaux destinés à la consommation humaine en vue de les retirer de la chaîne alimentaire,

- dans les dons de sang et dérivés sanguins destinés à la transfusion chez l'homme. En effet, comme le montre une présence de protéine pathogène PrP^{sc} dans le sang et les cellules lymphoïdes bien avant l'atteinte cérébrale, et donc bien avant la possibilité de déceler des signes neurologiques évocateurs de maladie à prions cliniquement déclarée,
- 5 la physiopathologie chez l'homme est méconnue. Ne pouvant réaliser des infections expérimentales comme chez le mouton, l'absence de test de détection dans le sang ou d'autres fluides biologiques ne permet pas de l'étudier et donc de prévenir une transmission interhumaine par don de sang, ou de traiter les personnes infectées avant que les lésions cérébrales n'aient débuté ; de même que
- 10 - dans les troupeaux animaux avant le stade neurologique, permettant ainsi d'éliminer les animaux infectés précocement, avant arrivée aux abattoirs.

La détection de la présence de PrP^{sc} dans des échantillons biologiques ou chez des animaux devient donc d'une extrême importance et plusieurs équipes de chercheurs développent des méthodes de détections immunologiques (WO02/086511). Par ailleurs,

15 des méthodes pour complexer à la PrP^{sc} des peptides, des peptides molécules ou des inhibiteurs en vue du traitement de vMCJ font l'objet de recherches actives. Toutefois, les méthodes de l'état de la technique se heurtent sans arrêt à la difficulté d'identifier la PrP^{sc} de manière fiable lorsqu'elle est en faible quantité dans un échantillon biologique.

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence contre toute attente que

20 l'utilisation d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et d'un ligand autre qu'un ligand protéique dans un test pour le diagnostic de la PrP dans un échantillon biologique susceptible de contenir une telle protéine, permettait la détection de cette protéine à des dilutions et dans des conditions où elle n'est pas détectable avec les méthodes utilisées actuellement, l'utilisation de ces

25 deux composants en combinaison ne modifiant pas la capacité de liaison de la PrP à un partenaire de liaison spécifique de la PrP utilisé dans le test diagnostique.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de détection de la PrP dans un échantillon biologique d'origine humaine ou animale susceptible de contenir de la PrP, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une molécule ayant au moins une charge

30 positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique.

Elle concerne également les kits de diagnostic pour la détection de la PrP,

comprenant un ligand autre qu'un ligand protéique et une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

Par ligand autre qu'un ligand protéique, on entend un composé capable de se lier à la PrP et de nature non protéique. A titre de ligand protéique exclu de l'invention, on
5 peut citer les anticorps anti-PrP.

Par molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique on entend une molécule ayant au moins une charge positive ou une molécule ayant une fonction engagée dans une liaison osidique, ou bien les deux.

Le procédé de l'invention a donc pour avantage de permettre la détection de la
10 PrP dans des échantillons biologiques où elle est présente en faible quantité grâce à l'utilisation combinée d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et d'un ligand autre qu'un ligand protéique tel que défini ci-dessus.

Les échantillons biologiques dans lesquels le procédé de détection de
15 l'invention est mis en œuvre sont tout échantillon d'origine animale ou humaine dans lequel on peut détecter de la PrP.

A titre d'exemple de tels échantillons, on peut citer le cerveau, les tissus du système nerveux central, les organes tels que la rate et l'intestin, ainsi que les fluides biologiques tels que le liquide céphalo-rachidien et le sang.

20 Les animaux qui peuvent être concernés par le procédé de l'invention sont les animaux qui développent les maladies à prion. On citera à titre d'exemple non limitatif les ovins et les bovins.

A titre de charge positive contenue dans les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on préfère les charges positives
25 apportées par des fonctions basiques, telles que des fonctions guanidinium.

A titre de liaison osidique contenue dans les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on préfère les liaisons de type hétéroside telles que celles retrouvées dans les macrolides et les aminoglycosides.

Les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison
30 osidique préférées aux fins de l'invention sont les molécules ayant à la fois au moins une charge positive et au moins une liaison osidique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les molécules ayant au moins une charge positive et au moins une liaison osidique sont choisies parmi les aminoglycosides à noyau guanidinium, la streptomycine étant particulièrement préférée.

L'utilisation d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins
5 une liaison osidique, en particulier d'un aminoglycoside, de préférence la streptomycine, de préférence encore sous forme de sel, permet la précipitation de la PrP présente dans l'échantillon biologique testé. Cette propriété de précipitation est accrue en présence de la PrP^{sc}, en particulier après traitement à la protéinase K (PrP^{res}). Cette précipitation est due à la formation d'agrégats de PrP (également appelés PrP réticulée
10 par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique) obtenus après traitement par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

L'ajout d'un ligand autre qu'un ligand protéique permet, à la différence des ligands protéiques, d'amplifier la sensibilité de détection de la protéine PrP et de mieux
15 capturer la PrP réticulée par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique. De ce fait, la PrP peut être détectée dans des échantillons biologiques où elle n'est présente qu'en de faibles quantités.

Contre toute attente, l'action d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique sur la PrP, puis la complexation du ligand autre
20 qu'un ligand protéique à l'agrégat de PrP ainsi formé et vice-versa, ne gêne en rien la détection de la PrP.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique est ajoutée audit échantillon biologique pour la précipitation de la PrP avant l'ajout du ligand autre
25 qu'un ligand protéique.

De préférence, pour favoriser la précipitation de la PrP, après ajout de la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on procède à un chauffage du milieu réactionnel à une température comprise entre 25 et 45°C, une température de 37°C étant préférée.

30 Avant mise en contact de l'échantillon biologique à tester avec ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, l'échantillon

peut être préalablement traité avec de la protéinase K pour permettre la digestion protéolytique de la PrP cellulaire. L'échantillon ainsi traité ne contient plus, comme protéine prion, que la protéine pathogène PrP^{sc} résistante (PrP^{res}). L'étape de traitement à la protéinase K est une étape discriminante pour la détermination des maladies à prions ou de la contamination par la PrP^{sc} des échantillons testés.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, le procédé de détection de la PrP de l'invention comprend l'étape supplémentaire d'ajout de protéinase K dans l'échantillon. Cette étape de digestion par la protéinase K peut être réalisée soit avant réticulation de la PrP avec ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, soit après une telle réticulation.

Selon encore un autre mode, le procédé de l'invention comprend les étapes consistant à :

- a) ajouter audit échantillon de la protéinase K pour digérer la PrP^c,
- b) ajouter au mélange ainsi obtenu ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique pour obtenir des agrégats de PrP,
- c) ajouter un ligand autre qu'un ligand protéique et
- d) révéler la présence de PrP^{res}.

Les agrégats de PrP, formés en présence de la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et contenant la PrP, peuvent être séparés du milieu réactionnel avant leur réaction avec le ligand autre qu'un ligand protéique, qu'il y ait ou non traitement préalable avec la protéinase K. Le procédé de séparation est mis en œuvre par tout procédé de séparation d'un précipité connu de l'homme du métier. A titre d'exemple, les agrégats de PrP sont séparés du milieu réactionnel par centrifugation, puis par élimination du surnageant. Cette étape de séparation permet d'éliminer tous produits non nécessaires à la réaction de détection ultérieure de la PrP tels que la protéinase K le cas échéant, les protéines digérées et la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique libre en solution.

Pour améliorer davantage la sensibilité du procédé de détection de l'invention, avant la réaction des agrégats de PrP avec le ligand autre qu'un ligand protéique, on

peut procéder également à une dénaturation desdits agrégats présents dans l'échantillon biologique à tester. Cette étape de dénaturation peut être mise en œuvre par tout procédé de dénaturation d'agrégats protéiques connu de l'homme du métier. De préférence, la dénaturation est mise en œuvre par ajout de guanidine HCl.

5 Ainsi, le procédé de détection de la PrP selon l'invention comprend de préférence au moins l'une des étapes supplémentaires i) et ii) suivantes consistant à :

- i) séparer les agrégats de PrP du mélange réactionnel et
- ii) dénaturer les agrégats de PrP.

ces étapes étant incluses le cas échéant entre l'étape b) et l'étape c).

10 Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de détection de l'invention met en œuvre les deux étapes i) et ii) successivement, de préférence entre l'étape b) et l'étape c).

La révélation de la présence de la PrP dans un échantillon biologique selon le procédé de l'invention peut être mise en œuvre selon les procédés classiques de
15 détection d'analytes dans un échantillon.

Elle peut par exemple être mise en œuvre par une détection immunologique ou non.

Par détection immunologique, on entend la mise en évidence d'une réaction immunologique avec la PrP, cette réaction immunologique consistant en la liaison entre
20 la PrP à détecter et un partenaire de liaison spécifique de la PrP ou bien en une réaction de compétition entre la PrP susceptible d'être contenue dans l'échantillon à tester et de la PrP marquée.

A titre de détection non immunologique, on peut citer par exemple les techniques de coloration sur gel d'électrophorèse bien connues de l'homme du métier.

25 La détection de la PrP par réaction immunologique peut-être mise en œuvre par exemple après addition d'un partenaire de liaison spécifique de la PrP.

Par partenaire de liaison spécifique de la PrP, on entend tout partenaire capable de se lier à la PrP. La visualisation de la réaction immunologique consistera alors en la visualisation du complexe partenaire de liaison spécifique de la PrP/PrP.

30 Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention est tel qu'on ajoute un partenaire de liaison spécifique de la PrP pour la réaction immunologique

entre le partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP, le cas échéant dans l'étape d).

A titre de partenaire de liaison spécifique de la PrP, on peut citer, par exemple, les anticorps, les fragments d'anticorps, les polypeptides, les protéines, les acides nucléiques, les haptènes et les aptamères.

Le terme « anticorps » inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétiques et des fragments d'anticorps.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un antigène cible d'intérêt, dans le cas présent la PrP, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment la PrP.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un antigène cible d'intérêt, le cas présent la PrP, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

A titre d'anticorps appropriés pour l'invention, on peut citer par exemple les anticorps 8G8, 12F10 (SpiBio, France) et 3F4 (Immunok).

Les fragments d'anticorps sont tels qu'ils conservent la fonction de liaison la PrP.

Par « polypeptide », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Par acides aminés, on entend les acides aminés primaires qui codent pour les protéines, les acides aminés dérivés après action enzymatique comme la *trans*-4-hydroxyproline et les acides aminés naturels, mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la N-méthyl-L-leucine, la staline (Hunt S. dans *Chemistry and Biochemistry of the amino acids*, Barrett GC, ed., Chapman and Hall, London, 1985), les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

Le terme « protéine » inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires.

Par acide nucléique, on entend les oligonucléotides, les acides désoxyribonucléiques et les acides ribonucléiques, ainsi que leurs dérivés.

Le terme « oligonucléotide » désigne un enchaînement d'au moins 2 nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides, ou les deux), naturels ou modifiés. Par nucléotide modifié, on entend par exemple un nucléotide comportant une base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de base modifiée, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine. Pour illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on peut mentionner les liaisons phosphorothioate, N-alkylphosphoramidate, alkylphosphonate et alkylphosphodiester. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans FR-A-2 607 507, les LNA tels que phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA décrits dans *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 8, Issue 16, 18 August 1998 ,pages 2219-2222, et les PNA qui font l'objet de l'article de M. Egholm et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1992), 114, 1895-1897, sont des exemples d'oligonucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

Le terme « haptène » désigne des composés non immunogènes, c'est-à-dire incapables par eux-mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production

d'anticorps, mais capables d'être reconnus par des anticorps obtenus par immunisation d'animaux dans des conditions connues, en particulier par immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le plus souvent inférieure à 2000 Da, et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les nucléosides et les nucléotides.

Les aptamères sont des partenaires de capture de nature protéique et nucléique qui ont pour fonction d'agir en tant qu'anticorps et de se lier à des ligands protéiques (Toulmé, J.J. et Giege, R. , 1998, *Medecine Science*, 14(2), 155-166).

Ces polypeptides, protéines, haptènes et aptamères ont tous la capacité de se lier à la PrP ou à l'agrégat de PrP.

La visualisation de la réaction immunologique entre le partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP mise en œuvre, notamment dans l'étape d), peut être effectuée par tout moyen de détection connu de l'homme du métier, tels que des moyens directs ou indirects.

Dans le cas de la détection directe, c'est-à-dire sans l'intermédiaire d'un marquage, on observe la réaction immunologique par exemple par résonance plasmon ou par voltamétrie cyclique sur une électrode portant un polymère conducteur.

Dans le cas de la détection indirecte, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un marquage, le marquage peut être effectué par l'intermédiaire dudit partenaire de liaison spécifique de la PrP qui sera alors préalablement marqué.

La visualisation de la présence de la PrP dans un échantillon biologique selon le procédé de l'invention peut également être mise en œuvre selon une méthode dite de compétition. On ajoute alors, notamment dans l'étape d), à la place du partenaire spécifique de liaison de la PrP, de la PrP préalablement marquée. Dans ce cas, le signal de détection est maximal en l'absence de PrP, puis diminue progressivement à mesure que la concentration en PrP recherchée, non marquée, augmente par la réaction de compétition.

Par marquage, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la α -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés, luminescents, colorants,
- 5 • les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I ,
- les molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, l'alexa ou les phycocyanines, et
- les particules telles que les particules en or, en latex magnétique, les liposomes.

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple par
 10 l'intermédiaire d'un autre couple ligand/antiligand. Les couples ligand/antiligand sont bien connus de l'homme du métier, et on peut citer par exemple les couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte l'agent de liaison. L'antiligand peut être détectable directement par les
 15 marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter à l'article J. Histochem. Cytochem.
 20 45 : 481-491, 1997.

Le marquage de protéines est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple par Greg T. Hermanson dans Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525B Street, San Diego, CA92101 USA.

Selon le type de marquage utilisé, comme par exemple en utilisant une enzyme,
 25 l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

De tels réactifs sont largement connus de l'homme du métier et sont décrits notamment dans Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, Edited by C. Price, D.J. Newman Stockton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New York.

La détection de la PrP peut être une détection en phase solide, c'est-à-dire
 30 utilisant une phase solide sur laquelle est immobilisé un partenaire de capture destiné à la capture de la protéine à détecter. Dans le cas de la présente invention, c'est le ligand

autre qu'un ligand protéique qui sert de partenaire de capture préalablement immobilisé sur un support solide. Un exemple de détection en phase solide bien connu de l'homme du métier est la détection de type sandwich, telle que la détection de type ELISA.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le ligand autre qu'un
5 ligand protéique est lié à un support solide.

A titre de support solide, on peut citer par exemple les billes, telles que les billes magnétiques, et les plaques de microtitrage.

Le ligand autre qu'un ligand protéique peut être lié au support solide de façon connue de l'homme du métier, telle que par adsorption ou liaison covalente, la liaison
10 covalente étant préférée.

Ainsi, le support solide peut être fonctionnalisé par une fonction susceptible de former une liaison avec une fonction portée par le ligand. Suivant un mode de réalisation préféré, le support solide est fonctionnalisé par une liaison NHS (N-hydroxysuccinimide) ou par une fonction NH_2 . Cette fonction peut réagir avec une
15 fonction portée sur le ligand. Dans ce mode de réalisation, les ligands portant une fonction susceptible de réagir pour former une liaison avec la liaison fonctionnelle du support solide, notamment portant une liaison NH_2 ou COOH , sont particulièrement préférés.

Des exemples de ligands autre que des ligands protéiques comprennent par
20 exemple les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes.

Ces ligands ont tous la particularité, à la différence des ligands protéiques, d'amplifier la sensibilité de détection de la protéine PrP.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le ligand autre qu'un ligand protéique est choisi parmi les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes.

25 Les glycosaminoglycanes sont largement connus de l'homme du métier et sont décrits par exemple dans Polysaccharides, M. Yalpani, Elsevier, Amsterdam, 1988.

A titre de glycosaminoglycanes appropriés aux fins de l'invention, on peut citer par exemple l'héparine, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, l'acide hyaluronique et le sulfate de kératane.

30 Par ligand macrocyclique, on entend un composé constitué d'une succession de cycles formant un macrocycle.

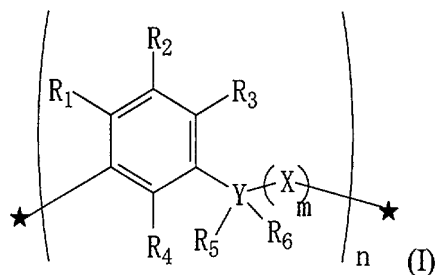
Les ligands macrocycliques sont connus de l'homme du métier. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer les cyclophanes, les métacyclophanes, les cyclodextrines, les cyclo(tétra-acides chromotropiques), les sphérands et les cyclo[n]vératrylènes.

5 Les ligands macrocycliques ont pour avantage particulier qu'ils permettent de piéger la protéine à tester, sous forme libre ou sous forme d'agrégat, par un effet cage.

Les ligands macrocycliques peuvent être préparés selon les techniques connues de l'homme du métier, par exemple décrites dans *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, Oxford, 1996.

10 Les ligands macrocycliques préférés pour le procédé de l'invention sont choisis parmi les métacyclophanes, les calix-arènes étant particulièrement préférés. De tels composés calix-arènes peuvent être obtenus suivant la méthodologie décrite dans Arduini, A. et al., 1996, *Macrocyclic Synthesis*, Eds. Harwood, L.M. & Moddy, C.J. Oxford University Press, Oxford et Da Silva et al., 2001, *J. Supramol. Chem.*, 1 :135-
15 138.

Selon un mode de réalisation préféré, le ligand macrocyclique de l'invention répond à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle

20 R_1 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

R_2 représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol, CH_2Pol , dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

25 R_3 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

R_4 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un

groupe OCH_2R ou un groupe OCOR , dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

R_5 et R_6 , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH_2 ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

5 R_5 et R_6 représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement CH_2 , ou un atome d'oxygène ou de soufre,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement
10 halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

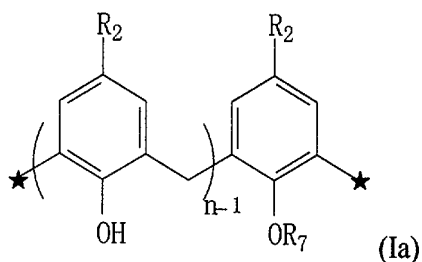
n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R_1 à R_5 , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

Ainsi, le composé de formule (I) se présente sous forme d'une succession de n
15 motifs caractérisés par la présence d'un cycle benzénique, et les substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Les chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, ramifiées ou non, cycliques ou non cycliques, substituées ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires, sont largement connues de l'homme du métier. A titre
20 d'exemples, on peut citer les alkyles, les alcènes, les aryles et les cycles saturés tels que le cyclohexane. Un exemple de groupement non polaire est CF_3 et des exemples de groupements polaires sont les substituants Pol tels que définis précédemment.

Les composés de formule (I) particulièrement préférés répondent à la formule (Ia) suivante :



25

dans laquelle

n est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate

R_7 représente un groupement $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$ ou un groupement $(CH_2)_t-COOH$ où t est un entier compris entre 0 et 6 et s est un entier compris entre 0 et 6.

5 Les composés de formule (Ia) particulièrement préférés sont ceux pour lesquels les deux groupements R_2 sont chacun un groupement sulfate, n est 4, 6 ou 8, et R_7 est un atome d'hydrogène, un groupement $-CH_2COOH$, un groupement $-CH_2CONH_2$ ou un groupement $-CH_2CH_2NH_2$, ce qui constitue un mode de réalisation de l'invention.

10 Selon un mode de réalisation préféré, le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) dans laquelle $n=6$, $X=Y$ =sulfate et R_7 est $-CH_2CH_2NH_2$.

Pour la mise en œuvre du procédé de détection immunologique de la PrP pathogène de l'invention, on peut utiliser des kits de diagnostic comprenant un ligand autre qu'un ligand protéique, de préférence un ligand macrocyclique, et une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

15 Selon un mode de réalisation préféré, ledit ligand autre qu'un ligand protéique présent dans le kit est lié à un support solide pour la mise en œuvre de la détection de la PrP pathogène selon un procédé de détection en phase solide.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 3, dans lesquelles :

20 - la figure 1 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP^{res} dans des échantillons de sérum de souris, de sérums d'ovins et de plasmas de bovins, positifs (+) ou négatifs (-),

- la figure 2 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP^{res} dans des échantillons de plasmas de bovins positifs (plasma +) ou négatifs (plasma -) en utilisant deux anticorps de révélation différents et

25

- la figure 3 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP^{res} dans des échantillons de sérums et de plasmas humains positifs vis-à-vis de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC +) ou négatifs (MCJ -) en utilisant deux anticorps de révélation différents.

30

Exemple 1 : prétraitement des échantillons**1. Echantillons d'organes solides tels qu'extrait de cerveau**

Les organes (cerveau, etc.) sont tout d'abord homogénéisés dans une solution de glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10%.

5 A 100 μ L de la solution homogénéisée décrite ci-dessus sont ajoutés 5 μ L d'une solution de la protéinase K (PK) dosée à 2mg/L, 1 μ L d'une solution de SDS à 10% et 6 μ L d'une solution de N-octyl- β -D-glyco-pyranoside à 2.5% p/v dans l'eau.

Le mélange est agité au vortex puis incubé à 37°C pendant 60 minutes.

10 500 μ L d'un mélange chloroforme : méthanol (1 : 2) sont ensuite ajoutés et le mélange est soumis à une agitation au vortex.

Ceci est suivi d'une étape de centrifugation à 15000tr/min à température ambiante pendant 10 minutes

15 Le surnageant est alors éliminé et le culot est remis en suspension dans 25 μ L d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6M. La suspension est incubée à 37°C pendant 30 minutes.

Enfin, 400 μ L d'une solution de PBS et du Tween 20 (0.05% p/v) sont ajoutés.

2. Echantillons de fluides biologiques tels que sérum et plasma :

20 Une solution de protéinase K est ajoutée à 100 μ L de sérum ou plasma de sorte que la concentration finale en enzyme soit de 80 μ g/mL. La solution est ensuite mélangée au vortex et incubée à 37°C pendant 30 minutes.

20 μ L d'une solution de sulfate de streptomycine à une concentration de 1g/mL sont ajoutés, le mélange est placé sous agitation et re-incubé à 37°C pendant 1 heure.

Après centrifugation à 15000tr/min pendant 10 minutes, le surnageant est rejeté.

25 Le culot résiduel est remis en suspension dans 25 μ L d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6M dans l'eau à l'aide d'une agitation au vortex. La suspension est ensuite incubée à 37°C pendant 30 minutes.

Puis sont ajoutés 400 μ L d'une solution de PBS (Phospahte Buffer Saline) avec 0,05% (p/v) de tampon Tween 20, le mélange est agité au vortex.

3. Echantillon préparé à partir du système nerveux

30 Les organes (cerveau, etc.) sont tout d'abord homogénéisés dans une solution de glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10% et filtrés.

La PK est utilisée à raison de 25 µg pour 100 mg de tissu. Après homogénéisation au vortex, le tube est placé 1 heure à l'étuve à 37°C.

L'action de la PK est stoppée par homogénéisation avec du Péfabloc® à 10 mM.

5 La préparation de l'ultracentrifugation comporte l'homogénéisation de 1000 µl de broyat digéré avec 600 µl de Sarkosyl à 30%. Le mélange est laissé au moins 15 minutes à température ambiante avant d'être transféré sur coussin de saccharose (400 µl de saccharose 10%) dans des tubes pour ultracentrifugation (Beckman, Quick Seal, 2,2 ml). Le tube est complété avec de l'eau ultra pure, puis soudé et placé dans le rotor pour
10 ultracentrifugation.

Celle-ci dure 2 heures à 100 000 rpm et 20°C.

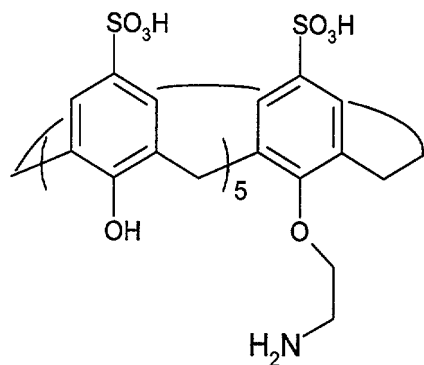
Les 2/3 du surnageant, dont la fraction lipidique, sont ensuite aspirés. Le culot est séché par retournement sur papier absorbant.

Puis le culot est repris par 100 ou 200 µl de PBS pour une utilisation immédiate
15 ou de tampon de dénaturation pour congélation. Dans ce dernier cas, les culots sont chauffés pendant 10 minutes à 100°C. Après refroidissement, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 12000 rpm à 20°C. Les surnageants sont congelés à -80°C.

20 **Exemple 2 : Préparation du ligand calix-arène *p*-sulphonato-3,7-(2-amino-éthoxy)-calix-[6]-arène (dénommé C6S)**

1. Préparation

Ce ligand adjuvant macrocyclique C6S possède la formule générale :



25 Ce ligand est préparé selon la méthode décrite dans Eric Da Silva et Anthony W. Coleman, Synthesis and complexation properties towards amino acids of

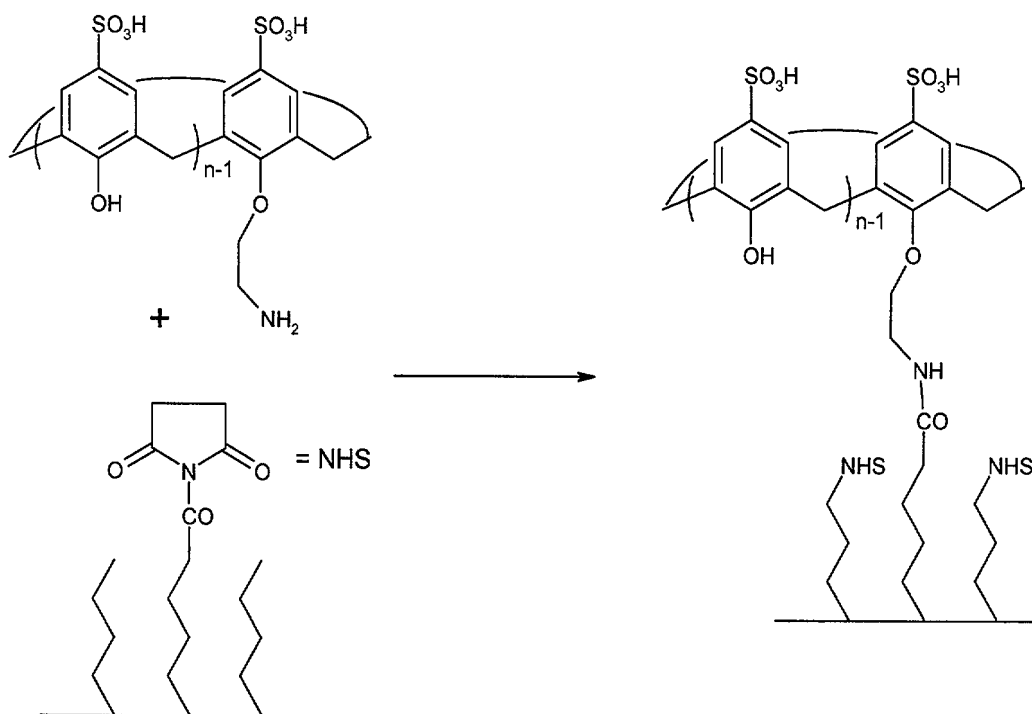
mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene, Tetrahedron 59 (2003) 7357-7364.

Ce ligand peut ensuite être couplé avec un support solide (bille ou plaque) portant une surface activée comme indiqué ci-après.

2. Greffage du ligand C6S sur plaques

- 5 Les plaques « NHS activated plates » de 96 puits proviennent de la société Covalab (Lyon, France). 100 μ L d'une solution de ligand sont dissous à différentes concentrations dans du Tampon Phosphate 50mM pH 8,2. Les puits sont lavés 3 fois (3 x 200 μ L) à l'eau MilliQ après deux heures d'incubation à 37°C. Les plaques sont séchées à température ambiante avant leur utilisation.

- 10 Schéma de greffage :

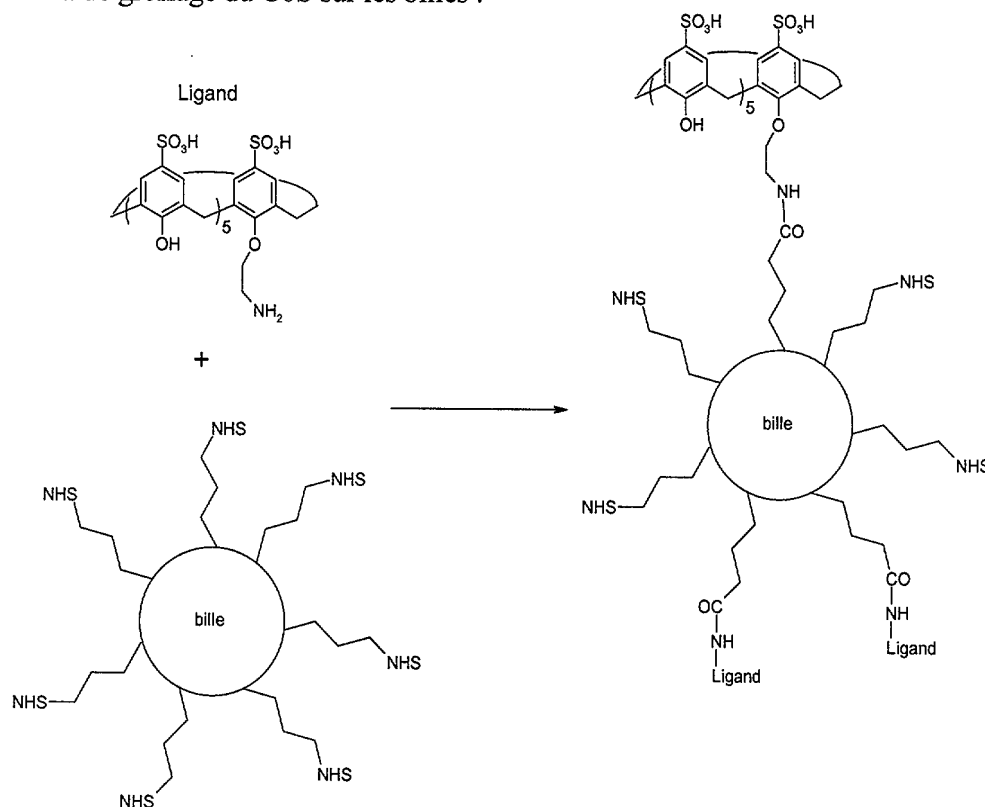


3. Greffage sur billes :

- 4 mL d'une solution de bille activée NHS (2 x 10⁹ billes /mL ; Dynabeads® M270Amine, Société Dynals, Norvège) sont aliquotés en tubes de 1 mL. Les billes sont centrifugées et précipitées par aimantation. Le surnageant est enlevé et les billes sont lavées 3 fois avec 1 mL d'eau. Le culot de bille est repris avec différents volumes de solution de calixarène dans un tampon phosphate 50mM pH 8,2. 600 μ L, 120 μ L, 60 μ L et 12 μ L d'une solution de ligand à 50 mg/mL (tampon phosphate 50mM, pH 8,2) sont

ajoutés. Les billes sont agitées pendant 24 heures à température ambiante. Les billes sont lavées 3 fois avec de l'eau MilliQ 18Ω afin d'éliminer le ligand qui n'a pas réagi. Les billes sont conservés dans 1 mL d'eau afin de reconstituer la concentration initiale de 2×10^9 billes / mL. La solution de bille est prête à l'emploi. Ces billes sont définies
5 comme « billes C6S » dans tout le texte.

Schéma de greffage du C6S sur les billes :



Exemple 3 : Détection de la PrP^{res}

10 1. Echantillons utilisés

Les échantillons de cerveaux, sérum, plasma bovins positifs sont issus d'animaux dont l'atteinte par une maladie à prion EST (Encéphalite Spongiforme Transmissible) a été confirmée par les méthodes classiques de référence dont une recherche par Western blot de PrP^{res} dans le tissu cérébral comme décrite par Madec et
15 al, 2000, Microbiol pathogenesis, 28 : 353-362. Les témoins négatifs correspondent à des échantillons de cerveaux, sérum et plasma d'animaux pour lesquels l'atteinte par les maladies à prion a été exclue par les mêmes analyses. L'anti-coagulant utilisé pour les

prélèvements de plasma est l'EDTA.

Ces échantillons sont fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

2. Détection de la PrP^{res} selon une méthode de type ELISA

5 Avant utilisation, les puits des plaques obtenues selon l'exemple 2, point 2 ci-dessus sont pré-saturées par un traitement par un mélange lait écrémé (5%) et PBS/Tween 20 (0.05% p/v) à 37°C pendant 60 minutes. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 800µL de PBS/Tween 20 (0.05% p/v) par puit. Le tampon résiduel est éliminé par retournement.

10 100µL de chaque échantillon de fluide biologique préparé selon l'exemple 1 ci-dessus, sont distribués dans les puits et la plaque est incubée à 37°C pendant 100 minutes sous agitation mécanique à 400 tr/min.

Suite à cette première incubation, chaque puit est relavé trois fois avec 800 µL du mélange PBS / Tween 20 (0.05% p/v) puis les plaques sont séchées.

15 L'anticorps anti-PrP de révélation, marqué par à la peroxydase et dilué à 0.05µg/mL dans le mélange PBS / Tween 20 (0.05% p/v) est ajouté à raison de 100µL par puit et la plaque est incubée de nouveau à 37°C pendant 60 minutes. L'anticorps utilisé reconnaît la région définie par les acides aminés 145-154 de la PrP humaine et les régions homologues des PrP animales (anticorps AC23).

20 La plaque est alors rincée trois fois avec 800µL d'une solution de PBS/Tween 20 (0.05% p/v) (PW41, Sanofi Pasteur) et le tampon résiduel est éliminé par retournement.

25 La révélation est effectuée par ajout de 100µL dans chaque puit, d'une solution de révélation préparée selon les recommandations du fabricant (kit bioMérieux). La plaque est incubée à température ambiante dans le noir pendant 10 minutes.

La réaction est stoppée par ajout de 50µL d'une solution d'acide sulfurique (1.8N).

La lecture du signal obtenu est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490nm (Spectrophotomètre PR2100, Biorad).

3. Détection de la PrPres dans le cerveau selon la technique Western Blot

30 Le protocole utilisé correspond au protocole de référence utilisé pour le

diagnostic de certitude des maladies à prion chez l'animal et décrit par Madec et al, 2000, Microbiol pathogenesis, 28 : 353-362.

4. Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

- 5 Tableau 1 : Représentation de la spécificité de détection par la méthodologie de type ELISA précédemment décrite de la PrP^{tes} dans le sérum et le plasma de bovins par comparaison avec le protocole de référence de type Western Blot effectué à partir du cerveau des mêmes animaux.

		ELISA			
		<i>Sérum</i>		<i>Plasma</i>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
Western Blot	Positif	6	0	3	0
	Négatif	0	8	0	1
<i>Cerveaux</i>					

10

Ces résultats montrent bien que le procédé de l'invention permet de détecter la PrP dans les fluides biologiques en raison de la concordance entre les deux tests (procédé de l'invention et Western Blot de référence).

- 15 Par ailleurs, le procédé de l'invention est également applicable aux fluides physiologiques tels que les sérums et plasmas.

Exemple 4 : Application du procédé de l'invention aux différentes espèces

1. Echantillons

- 20 Outre les échantillons utilisés dans l'exemple 3 ci-dessus, on a utilisé des échantillons de cerveaux, sérum, plasma ovins positifs issus d'animaux dont l'atteinte par la maladie à prions scrapie (tremblante) a été confirmée par une recherche par Western blot de PrPres dans le tissu cérébral.

- 25 Les échantillons de sérum murin ont été prélevés sur des souris C57BL6 auxquelles ont été préalablement inoculés par injection intra-péritonéale, 100 µl d'une suspension de cerveau de mouton atteint par une souche de scrapie C506M3 adaptée à

la souris, à 10% dans une solution de glucose 5% et diluée au 1/200^{ème}. Le sang a été collecté au niveau du sinus orbital 15 jours après l'inoculation.

Ces échantillons ont également été fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

5 2. Détection de la PrP^{res} dans les fluides biologiques selon une méthode de type ELISA

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus.

3. Résultats

10 Les résultats sont reportés sur la figure 1 donnant les valeurs de DO obtenues dans des échantillons de sérum de souris, de sérums d'ovins et de plasmas de bovins, positifs ou négatifs (+ ou -).

 Cette figure met en évidence que, de façon surprenante, quelle que soit l'espèce considérée, la valeur de densité optique des échantillons issus d'animaux atteints de maladie à prions est significativement positive comparée aux échantillons issus
15 d'animaux témoins.

Le procédé de l'invention est donc applicable à différentes espèces.

Exemple 5 : Utilisation de différents anticorps dans le procédé de l'invention

1. Echantillons

20 On a utilisé des échantillons de bovin comme décrit dans l'exemple 3 ci-dessus.

2. Détection de la PrP^{res} dans les fluides biologiques selon une méthode de type ELISA

 On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus en utilisant comme anticorps de révélation, soit l'anticorps AC23 tel que décrit précédemment, soit
25 l'anticorps 8D11G12 (bioMérieux, France).

3. Résultats

 Les résultats sont reportés sur la figure 2 donnant les valeurs de DO obtenues dans des échantillons de plasmas de bovins positifs ou négatifs (+ ou -).

 Cette figure met en évidence que le procédé de l'invention peut être mis en
30 œuvre avec différents anticorps anti-PrP.

Exemple 6: Détection de la PrP^{res} dans le cerveau**1. Echantillons**

Les échantillons utilisés correspondent à des échantillons de cerveau issus de bovins positifs et négatifs dont l'atteinte par une maladie à prion a été confirmée ou infirmée par les méthodes classiques de référence dont la recherche par Western Blot de PrP^{res} dans le tissu cérébral.

Ces échantillons ont été fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

2. Détection de la PrP^{res} dans le cerveau selon une méthode de type ELISA

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus.

3. Résultats

Le tableau 2 ci-dessous compare les résultats obtenus sur les mêmes échantillons de cerveau par la méthode de référence Western Blot avec ceux obtenus par le procédé de l'invention.

Tableau 2

Echantillon		ELISA	
		<i>Positif</i>	<i>Négatif</i>
Western Blot	<i>Positif</i>	4	0
	<i>Négatif</i>	0	20

Ce tableau met en évidence que, de façon surprenante, les résultats obtenus avec le procédé de l'invention sont parfaitement concordants avec ceux obtenus par la méthode de référence Western blot.

Le procédé de l'invention a donc une sensibilité de détection spécifique de la PrP^{res} dans le cerveau au moins comparable à celle obtenue avec la méthodologie de référence Western blot.

Exemple 7: Détection de la PrP^{res} dans le sérum et le plasma humain**1. Echantillons**

Les échantillons utilisés correspondent à des échantillons de plasma et de sérum issus de patients positifs et négatifs dont l'atteinte par la maladie de Creutzfeldt-Jakob a été confirmée ou infirmée par les méthodes classiques de référence.

2. Détection de la PrP^{res} dans le sérum et le plasma selon une méthode de type ELISA

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus en utilisant comme anticorps de révélation, soit l'anticorps AC23 tel que décrit précédemment, soit l'anticorps 8D11G12 (bioMérieux, France).

3. Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 3 qui est une représentation graphique donnant les valeurs de DO obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP^{res} dans des échantillons de sérum et de plasmas humains positifs vis-à-vis de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC +) ou négatifs (MCJ -) en utilisant deux anticorps de révélation différents.

La figure 3 met en évidence que, de façon surprenante, le procédé de l'invention permet la détection de la PrP^{res} de façon spécifique, dans le sérum et le plasma de patients humain atteints de MCJ.

Le procédé de l'invention est donc également applicable à l'homme.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la PrP dans un échantillon biologique d'origine
5 humaine ou animale susceptible de contenir de ladite PrP, caractérisé en ce qu'il met en
oeuvre une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison
osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique.

2. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 1, caractérisé en ce que
10 ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique
est ajouté audit échantillon biologique pour la précipitation de la PrP avant l'ajout du
ligand autre qu'un ligand protéique.

3. Procédé de détection de la PrP selon l'une des revendications 1 ou 2,
15 caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire d'ajout de protéinase K dans
l'échantillon.

4. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à
3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- 20 a) ajouter audit échantillon de la protéinase K pour digérer la PrP^c,
b) ajouter au mélange ainsi obtenu ladite molécule ayant au moins une charge
positive et/ou au moins une liaison osidique pour obtenir des agrégats de
PrP,
c) ajouter un ligand autre qu'un ligand protéique et
25 a) révéler la présence de PrP^{res}.

5. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à
4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une des étapes supplémentaires i) et ii)
suivantes consistant à :

- 30 i) séparer les agrégats de PrP du mélange réactionnel et
ii) dénaturer les agrégats de PrP,

ces étapes étant incluses le cas échéant entre l'étape b) et l'étape c).

6. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que on ajoute un partenaire de liaison spécifique de la PrP pour une réaction immunologique entre partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP, le cas échéant dans l'étape d).

7. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le ligand autre qu'un ligand protéique est lié à un support solide.

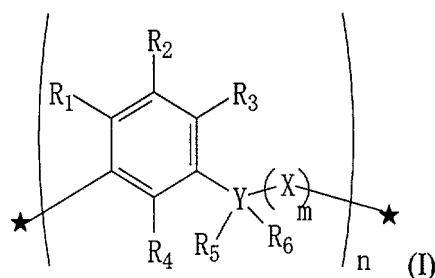
8. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique est un aminoglycoside, de préférence la streptomycine, de préférence encore sous forme de sel.

9. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le ligand autre qu'un ligand protéique est choisi parmi les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes, de préférence les ligands macrocycliques.

10. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 9, caractérisé en ce que les ligands macrocycliques sont choisis parmi les métacyclophanes, de préférence parmi les calix-arènes.

25

11. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle

R_1 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

5 R_2 représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol, CH_2 Pol, dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

R_3 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

10 R_4 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe OCH_2R ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

R_5 et R_6 , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH_2 ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

15 R_5 et R_6 représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement CH_2 , ou un atome d'oxygène ou de soufre,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

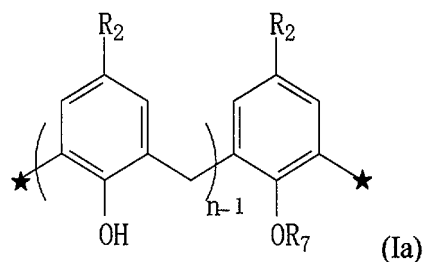
R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement
20 halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R_1 à R_5 , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

25 12. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 11, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) suivante :

27



dans laquelle

n est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou
 5 un groupement phosphate

R_7 représente un groupement $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$ ou un groupement $(CH_2)_t-COOH$ où t est un entier compris entre 0 et 6 et s est un entier compris entre 0 et 6.

10 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit ligand est un calix-arène de formule (Ia) dans lequel les deux groupements R_2 sont chacun un groupement sulfate, n est 4, 6 ou 8, et R_7 est un atome d'hydrogène, un groupement $-CH_2COOH$, un groupement $-CH_2CONH_2$ ou un groupement $-CH_2CH_2NH_2$.

15 14. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) dans laquelle $n=6$, $X=Y=\text{sulfate}$ et R_7 est $-CH_2CH_2NH_2$.

20 15. Kit de diagnostic pour la détection de la PrP, caractérisé en ce qu'il comprend un ligand autre qu'un ligand protéique et une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

16. Kit de diagnostic selon la revendication 15, caractérisé en ce que ledit ligand autre qu'un ligand protéique est lié à un support solide.

25

1/2

Figure 1

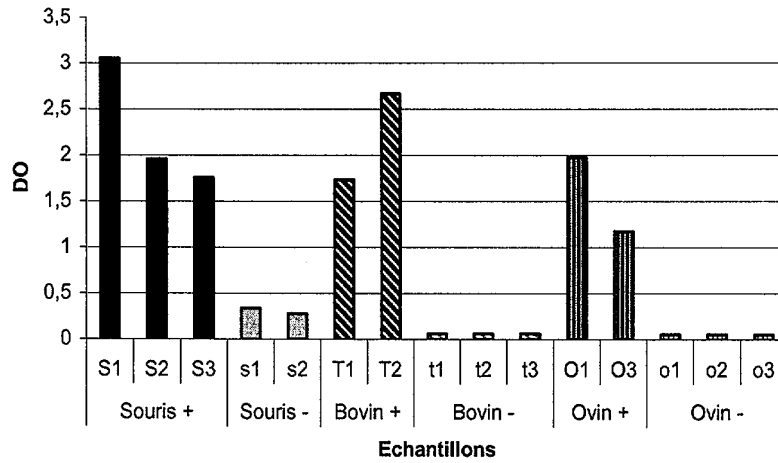
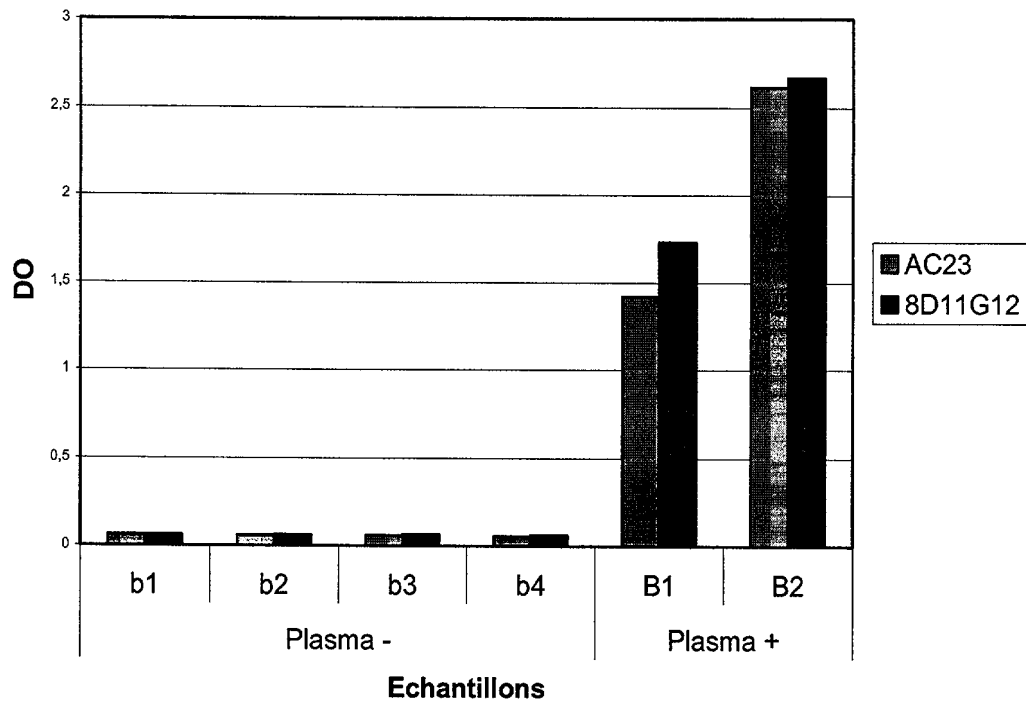
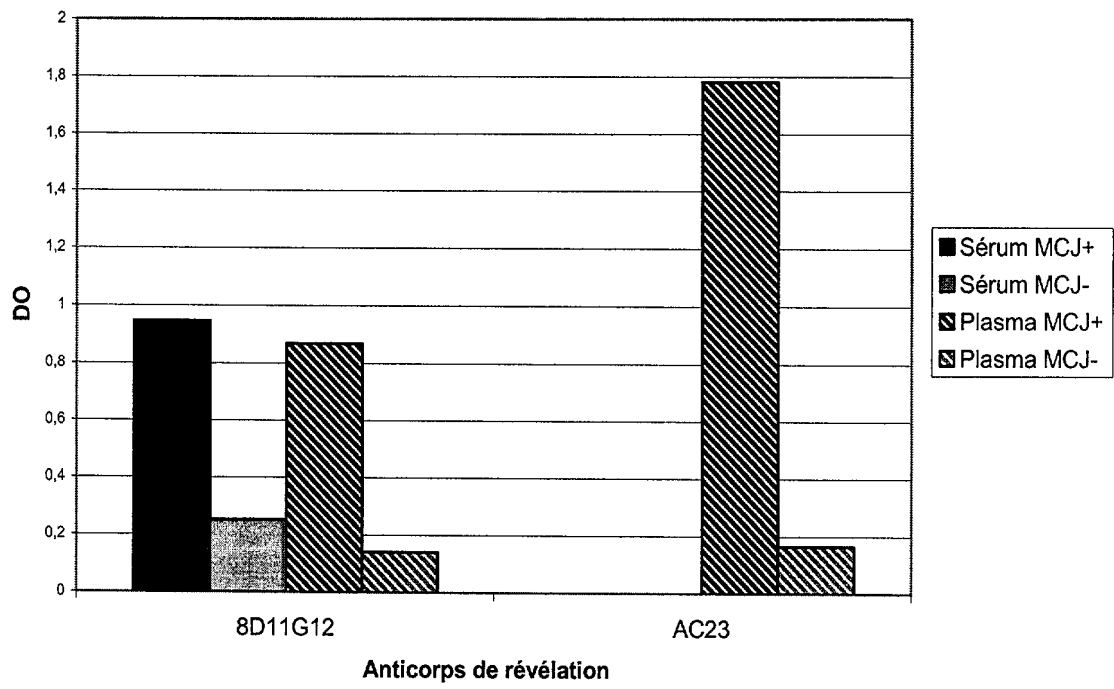


Figure 2



2/2

Figure 3





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 644845
FR 0400492

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WANG FEI ET AL: "Cytotoxicity of poly(phenolic)sulfonates and their sodium salts in L1210 lymphoid leukemia cells" METAL-BASED DRUGS, vol. 5, no. 3, 1998, pages 147-160, XP009036854 ISSN: 0793-0291 * abrégé; tableau 1 *	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	WO 02/065133 A (SALAMA ABDULGABAR ; KIESEWETTER HOLGER (DE)) 22 août 2002 (2002-08-22) * abrégé; revendications 1-4 * * page 5, ligne 27 - page 6, ligne 8 *	1-16	
A	US 2002/137114 A1 (TURECEK PETER ET AL) 26 septembre 2002 (2002-09-26) * abrégé; revendications 30,36 * * alinéa [0042] *	1-16	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 septembre 2004		Jenn, T	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

4
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0400492 FA 644845**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23-09-2004

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004059322 A	15-07-2004	FR 2849205 A1	25-06-2004
		WO 2004059322 A1	15-07-2004

WO 02065133 A	22-08-2002	DE 10107083 A1	29-08-2002
		WO 02065133 A2	22-08-2002
		EP 1360502 A2	12-11-2003
		JP 2004518966 T	24-06-2004
		US 2004096902 A1	20-05-2004

US 2002137114 A1	26-09-2002	WO 02057793 A2	25-07-2002
