

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①① N° de publication :

3 142 558

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

②① N° d'enregistrement national :

22 12390

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/543** (2023.01), C 07 F 9/658, C 07 H 21/00,
C 08 G 83/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 28.11.22.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.05.24 Bulletin 24/22.

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

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *DENDRIS Société par actions simpli-
fiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : MAJORAL Jean-Pierre, FRANCOIS
Jean-Marie, CONTIE Yohan, CAZAUDARRE Thomas
et BERNARD Elodie.

⑦③ Titulaire(s) : DENDRIS Société par actions simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : IPSIDE.

⑤④ **SUPPORT SOLIDE FONCTIONNALISÉ PAR DES DENDRIMÈRES, BIOPUCE COMPRENANT UN TEL
SUPPORT SOLIDE ET UTILISATION POUR LA DÉTECTION D'UNE MOLECULE CIBLE DANS UN MILIEU.**

⑤⑦ L'invention concerne un support solide ou semi-solide
comprenant une surface sur laquelle sont fixés des dendri-
mères phosphorés comportant à leur périphérie au moins
un groupement fonctionnel pour leur liaison covalente audit
support et au moins un groupement fonctionnel libre. Les-
dits dendrimères sont constitués d'un noyau central phos-
phoré P0 comprenant au moins deux groupements à partir
desquels sont formées plusieurs couches successives,
comprenant 1 à 4 couches intermédiaires dépourvues
d'atomes de phosphore et une couche externe. Un tel sup-
port est facile et rapide à fabriquer, et une biopuce le com-
prenant s'avère particulièrement performante pour la
détection de molécules cibles dans un milieu.

FR 3 142 558 - A1



Description

Titre de l'invention : SUPPORT SOLIDE FONCTIONNALISÉ PAR DES DENDRIMÈRES, BIOPUCE COMPRENANT UN TEL SUPPORT SOLIDE ET UTILISATION POUR LA DÉTECTION D'UNE MOLÉCULE CIBLE DANS UN MILIEU

- [0001] La présente invention s'inscrit dans le domaine de la détection de molécules cibles dans un milieu donné, en particulier un échantillon biologique.
- [0002] Plus particulièrement, la présente invention concerne un support solide ou semi-solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés, un procédé pour la préparation d'un tel support, et son utilisation pour la fabrication d'une biopuce. L'invention concerne également une biopuce comprenant un tel support et son utilisation pour la détection d'une molécule cible dans un échantillon.
- [0003] La détection de molécules, chimiques ou biochimiques, au sein d'un milieu donné, se définit comme la perception, via la mise en place d'un dispositif et/ou d'un procédé physico-chimique ou biochimique, de la présence ou de l'absence des molécules ciblées.
- [0004] Une telle détection trouve intérêt dans de nombreuses applications, pour répondre à différentes finalités, telles que le diagnostic médical ou sanitaire (détection de marqueurs moléculaires associées à une maladie ou de molécules constitutives d'organismes notamment pathogènes), le diagnostic environnemental (détection de molécules polluantes, détection des micro-organismes présents dans un milieu donné), la sélection et/ou identification microbienne et/ou agronomique (détection de transcrits suite à l'expression de gènes ou de molécules protéiques produites de ces transcrits), etc.
- [0005] Les molécules cibles peuvent être de tous types ; il peut s'agir de molécules organiques (acides nucléiques, protéines, polysaccharides, chaînes d'acides gras, *etc.*) et il est important de pouvoir disposer de méthodes de détection adaptées à leurs spécificités structurales et fonctionnelles.
- [0006] A titre d'exemple, les solutions de détection reposant sur les technologies génomiques exploitent les données de séquençage des génomes qui sont déposées dans des bases de données publiques telles que NCBI. Les laboratoires de recherche publics et les industriels y ont recours de manière massive pour la détection de molécules d'intérêt, avec des applications dans différents domaines d'activité (santé humaine, sélection végétale, agroalimentaire, *etc.*).
- [0007] Pour la détection de microorganismes pathogènes, par exemple, un test de détection et de quantification des légionelles par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

est décrit dans la norme NF T 9-471. Ce test est actuellement couramment mis en œuvre pour quantifier des bactéries de l'espèce *Legionella pneumophila* dans les tours aéro-réfrigérantes, en alternative des techniques de culture. Le taux de détection des espèces de légionnelles par PCR est généralement élevé (plus de 90% d'échantillons positifs), mais la mise en œuvre de ce test nécessite plusieurs étapes relativement chronophages et complexes à mettre en œuvre, et il ne permet pas de détection multi-spécifique, c'est-à-dire la détection de plusieurs pathogènes à la fois.

[0008] Les biopuces constituent quant à elles des technologies de détection issues de la combinaison des compétences en chimie, biologie, microélectronique, et bio-informatique. Il s'agit plus particulièrement d'outils permettant l'analyse d'interactions entre une sonde fixée sur un support et une cible. Typiquement, le support, solide ou semi-solide, est fonctionnalisé par une molécule présentant des fonctions libres sur lesquelles sont fixées des molécules sondes, aptes à interagir de manière spécifique avec une ou des molécules cible(s) donnée(s), également appelées molécules d'intérêt, dont on souhaite déterminer la présence éventuelle dans un milieu. Les molécules sondes sont typiquement des biomolécules de nature différente selon le type de biopuce concernée : on peut citer, de manière non exhaustive, des acides nucléiques (biopuces à ADN), protéines ou peptides (biopuces à protéines), glycanes ou biomolécules glycosylées (biopuces à sucres), ou des cellules entières (biopuces à cellules).

[0009] Pour répondre à des objectifs de plus en plus ambitieux, les utilisateurs sont amenés à utiliser des biopuces avec des exigences croissantes en termes de spécificité et fiabilité de détection d'une part, et en termes de simplicité et de rapidité de mise en œuvre d'autre part. La réduction des coûts de fabrication des biopuces constitue également un critère important pour ces structures du fait de l'augmentation constante des besoins en termes de volumes d'analyse.

[0010] Un type de biopuce particulière, couramment qualifiée de « dendripuce » utilisant un support fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés, a été décrite dans le document FR2838737A1. La biopuce divulguée dans ce document utilise un support comprenant au moins une surface fonctionnalisée de façon covalente par des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels et jusqu'à 12 couches d'unités dendrimériques porteuses d'atomes de phosphore qui permettent d'en rigidifier la structure afin d'assurer une bonne sensibilité de détection à la biopuce. Ces dendrimères phosphorés, qui présentent une taille comprise entre 1 et 20 nanomètres, comportent à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules sondes. Ces dendrimères sont généralement construits par la succession itérative de deux étapes de synthèse à partir du cœur. La première étape est la formation de fonctions aldéhydes libres sur la molécule. La deuxième étape crée les points de ramification entre les

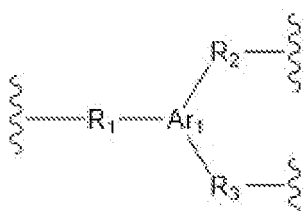
couches successives et consiste en une réaction de condensation avec un composé ayant deux types de fonctions : un groupement NH_2 et au moins un groupement PCl_2 . La suite itérative des étapes de synthèse permet de construire des dendrimères de génération croissante. Ainsi, la formation d'un dendrimère phosphoré de taille suffisante pour sa mise en œuvre au sein d'une biopuce performante nécessite au moins 11 étapes de synthèse. Les biopuces décrites dans ce document présentent de bonnes performances avec un bruit de fond faible et une intensité de signal de détection élevée.

[0011] La présente invention vise à proposer un support fonctionnalisé permettant la fabrication d'une biopuce qui soit tout aussi performante que les biopuces de l'art antérieur, et qui soit même plus performante sur le plan de la sensibilité et/ou reproductibilité de détection, ce support fonctionnalisé étant plus facile, plus rapide et moins coûteux à fabriquer que les supports fonctionnalisés à dendrimères phosphorés pour biopuces proposés par l'art antérieur, en particulier tels que décrits ci-avant.

[0012] A cet effet, il est proposé par la présente invention un support solide ou semi-solide, dit « support fonctionnalisé », comprenant une surface sur laquelle sont fixés des dendrimères phosphorés comportant à leur périphérie au moins un groupement fonctionnel pour leur liaison covalente audit support et au moins un groupement fonctionnel libre. Ces dendrimères sont constitués d'un noyau central phosphoré P0 comprenant au moins deux groupements à partir desquels sont formées plusieurs couches successives, comprenant :

- n couches intermédiaires, identiques ou différentes, n étant un nombre entier compris entre 1 et 4, chacune des couches intermédiaires étant constituée d'unités P1, identiques ou différentes, répondant chacune à la formule générale (I) :

[0013] [Chem.1]



[0014] dans laquelle :

R_1 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement $-\text{NH}-$ ou $-\text{NR}_4-$ où R_4 représente un groupement alkyle linéaire, ramifié et/ou cyclique, saturé ou insaturé, comprenant de 1 à 5 carbones, ou R_1 représente un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire, ramifié et/ou cyclique, comprenant de 1 à 6 atomes de carbones, éventuellement substitué et/ou éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N, Si et S,

Ar_1 représente un cycle aromatique comprenant 6 ou 8 chaînons, éventuellement

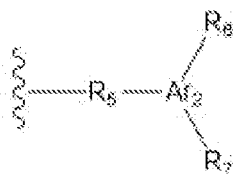
substitué par un ou plusieurs groupements alkyle linéaires, ramifiés et/ou cycliques comprenant chacun de 1 à 3 carbones,

R_2 et R_3 , identiques ou différents, représentent chacun un radical carboné saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 1 à 3 atomes de carbones,

lesdites couches intermédiaires étant dépourvues d'atome de phosphore,

- et une couche externe constituée d'unités P2, identiques ou différentes, répondant chacune à la formule générale (II) :

[0015] [Chem.2]



(II)

[0016] dans laquelle

R_5 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupement alkyle linéaire, ramifié et/ou cyclique, saturé ou insaturé, comprenant de 1 à 5 carbones, ou R_5 représente un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire, ramifié et/ou cyclique, comprenant de 1 à 6 atomes de carbones, éventuellement substitué et/ou éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N, Si et S,

Ar_2 représente un cycle aromatique comprenant 6 ou 8 chaînons, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements alkyle linéaires, ramifiés et/ou cycliques comprenant chacun de 1 à 3 carbones,

R_6 et R_7 , identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène, un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, -CH=O, -CH₂OH, -CH₂Cl, -OH, -SH, -CH₂-SH, -CO-OCH₃, -COOH, -NHR₉, -NR₁₂R₁₃, -O-R₉, -R₉-SO₂-R₁₀, -CN₃, -CNO₂, -P(O)(OR₉)OR₁₀ et -P(O)R₉R₁₀R₁₁, ou un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 1 à 3 atomes de carbones et comprenant au moins un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, -CH=O, -CH₂OH, -CH₂Cl, -OH, -SH, -CH₂-SH, -CO-OCH₃, -COOH, -NHR₉, -NR₁₂R₁₃, -O-R₉, -R₉-SO₂-R₁₀, -CN₃, -CNO₂, -P(O)(OR₉)OR₁₀ et -P(O)R₉R₁₀R₁₁,

où

R_9 , R_{10} et R_{11} , identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 5 atomes de carbones,

R_{12} et R_{13} , identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 5 atomes de carbones, ou R_{12} et R_{13} forment ensemble, avec l'atome d'azote auxquels ils sont attachés, un cycle à 5 à 7 chaînons,

saturé ou insaturé,

R_6 et R_7 ne représentant pas simultanément un atome d'hydrogène.

- [0017] Dans les dendrimères du support fonctionnalisé selon l'invention, une partie desdits groupements fonctionnels entrant dans la constitution de R_6 et/ou R_7 sont impliqués dans la liaison covalente des dendrimères à la surface du support, l'autre partie restant libre et pouvant notamment être mise à profit pour la fixation ou la synthèse *in situ* ultérieures de molécules sondes dans le contexte d'une application du support selon l'invention à la fabrication d'une biopuce.
- [0018] Les dendrimères sont des polymères à structure ramifiée arborescente formés par un procédé itératif à partir d'un noyau central comportant plusieurs fonctions réactives, par branchement radial répétitif, depuis ce noyau central, de ramifications concentriques, chacune portant plusieurs fonctions réactives pour le branchement du niveau de ramifications suivant. Chaque nouvelle génération de dendrimère est obtenue par introduction d'un nouveau niveau de ramification sur le précédent.
- [0019] Comme exposé ci-avant, l'utilisation de dendrimères pour la fabrication de biopuces, en tant que bras espaceurs entre un support solide ou semi-solide et des molécules sondes d'une biopuce, s'avère particulièrement avantageuse en raison de leurs propriétés structurales spécifiques. Plus précisément, le nombre important de groupements fonctionnels libres qui sont présents en périphérie des dendrimères permet de fixer une densité importante de molécules sondes par unité de surface du support, ainsi qu'une meilleure accessibilité des molécules sondes, ce dont il résulte avantageusement une sensibilité de détection élevée.
- [0020] Le support selon la présente invention tire avantageusement profit de ces propriétés générales des dendrimères. En outre, et de manière tout à fait surprenante, il a été découvert par les présents inventeurs que le support fonctionnalisé répondant à la définition de la présente invention, c'est-à-dire comportant des dendrimères présentant la structure chimique particulière ci-dessus décrite, lorsqu'il est intégré dans une biopuce, confère à cette dernière des propriétés particulièrement bonnes en termes de fiabilité, de reproductibilité et sensibilité de détection. Une telle performance est d'autant plus surprenante que d'une part, les dendrimères conformes à l'invention présentent une petite taille, en raison du faible nombre de couches intermédiaires qu'ils comportent, et donc comportent un nombre réduit de fonctions libres à leur surface pour la fixation de molécules sondes, et que d'autre part, ils sont dépourvus d'atomes de phosphore dans leurs couches intermédiaires, atomes de phosphore dont la personne du métier sait qu'ils rigidifient la structure des dendrimères, et que ceci participe à la performance des biopuces dans lesquelles ils sont intégrés.
- [0021] Par exemple, et comme démontré dans les exemples ci-après, les inventeurs ont mis en évidence que les dendrimères tels que définis ci-dessus, utilisés pour fonctionnaliser

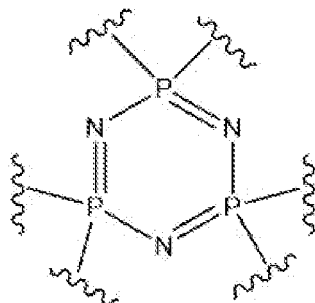
une biopuce, permettent d'obtenir un signal de détection d'intensité supérieure à celui obtenu avec une biopuce utilisant les dendrimères proposés par l'art antérieur, dans lesquels chacune des couches intermédiaires contient des atomes de phosphore, et qui présentent pourtant en périphérie un nombre beaucoup plus important de groupements fonctionnels libres pour le branchement de molécule(s) sonde(s). Les inventeurs ont ainsi montré que les biopuces formées d'un support fonctionnalisé selon l'invention présentent de meilleures performances en termes de fiabilité, reproductibilité et sensibilité de détection, ce dont témoigne notamment l'obtention de spots de détection mieux définis et plus ronds que ceux obtenus avec des biopuces intégrant des dendrimères de l'art antérieur. Ces performances améliorées ont été observées alors même que la petite taille des dendrimères entrant dans la constitution du support fonctionnalisé selon l'invention, et l'absence d'atomes de phosphore dans leurs couches intermédiaires, laissaient présager du contraire.

- [0022] Le support selon l'invention peut être de nature solide ou semi-solide, tel qu'un gel. Il peut être rigide ou flexible, et présenter toute forme. Sa surface fonctionnalisée par les dendrimères est de préférence sensiblement plane.
- [0023] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, le support est formé en verre, en silicium, en plastique ou en métal. Des supports pouvant être utilisés dans le cadre de l'invention sont par exemple les lames, les billes et les capillaires en verre, ou encore les supports comportant au moins une surface d'or.
- [0024] Selon le matériau qui la constitue, la surface du support peut avoir été soumise à un prétraitement visant à y fixer un ou des groupement(s) fonctionnel(s) apte(s) à réagir avec des groupements fonctionnels libres de dendrimères, pour permettre la fixation de ces derniers par liaison covalente sur cette surface. Il entre dans les compétences de l'homme du métier de déterminer quel prétraitement doit être réalisé, et de quelle manière, en fonction du matériau particulier constituant la surface du support et des groupements fonctionnels présents en périphérie des dendrimères. A titre d'exemple d'un tel traitement, lorsque le support est formé en verre, il peut avoir préalablement été soumis à un prétraitement par silanisation de sa surface, réalisé de manière classique en elle-même.
- [0025] Les dendrimères du support selon l'invention peuvent présenter l'une ou plusieurs des caractéristiques ci-après, mises en œuvre séparément ou selon chacune de leurs combinaisons techniquement opérantes.
- [0026] Le noyau central P0 des dendrimères peut comporter au moins deux groupements sur lesquels sont greffées les unités P1 de la première couche intermédiaire. Préférentiellement, le noyau central P0 comporte au moins trois tels groupements, de préférence au moins quatre, et de préférence encore au moins cinq. Le noyau central P0 peut en particulier comporter six groupements sur lesquels sont greffées les unités

P1 de la première couche intermédiaire.

[0027] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, le noyau central P0 des dendrimères répond à la formule (IIIa) suivante :

[0028] [Chem.3]

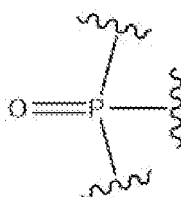


(IIIa)

[0029] Ce noyau central particulier est représenté, dans certaines des formules chimiques ci-après, pour plus de commodité de représentation des dendrimères selon l'invention, par la formule « N_3P_3 ».

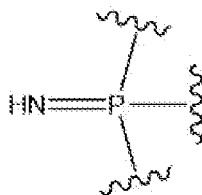
[0030] Le noyau central P0 peut autrement par exemple répondre à la formule (IIIb), à la formule (IIIc) ou à la formule (IIId) suivantes :

[0031] [Chem.4]



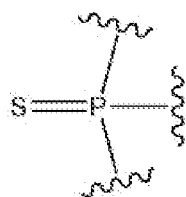
(IIIb)

[0032] [Chem.5]



(IIIc)

[0033] [Chem.6]

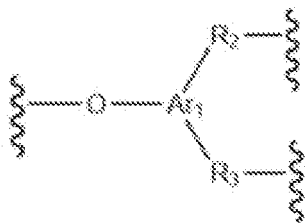


(IIId).

- [0034] Le nombre de couches intermédiaires des dendrimères selon l'invention peut être compris entre 1 et 4. Il est préférentiellement égal à 2 ou 3. Chacune de ces couches intermédiaires successives comprend 2 fois plus d'unités P1 que la couche intermédiaire précédente.
- [0035] Les unités P1 au sein d'une même couche intermédiaire du dendrimère peuvent être différentes les unes des autres. Elles sont préférentiellement toutes identiques. De la même façon, les unités P1 d'une couche intermédiaire peuvent être différentes des unités P1 d'une autre couche intermédiaire. Dans des modes de réalisation préférés de l'invention, notamment particulièrement avantageux sur le plan de la facilité du mode de synthèse, l'ensemble des unités P1 de toutes les couches intermédiaires des dendrimères sont identiques les unes aux autres.
- [0036] Une ou plusieurs, de préférence l'ensemble, des unités P1 du dendrimère selon l'invention peuvent répondre à l'une ou plusieurs des caractéristiques ci-après.
- [0037] Le cycle aromatique Ar_1 peut être un hétérocycle, comprenant par exemple un ou plusieurs atomes d'oxygène, azote et/ou soufre en lieu et place d'un ou plusieurs atomes de carbone du cycle. Il est de préférence uniquement constitué d'atomes de carbone.
- [0038] Les groupements R_1 , R_2 et R_3 peuvent être disposés à toute position les uns par rapport aux autres sur le cycle aromatique Ar_1 . Préférentiellement, ils ne sont pas situés sur des atomes adjacents du cycle, notamment en position ortho les uns par rapport aux autres dans le cas d'un cycle aromatique à 6 chaînons.
- [0039] Dans les modes de réalisation particuliers de l'invention dans lesquels Ar_1 représente un cycle aromatique à 6 chaînons, R_2 et R_3 sont de préférence situés en position méta l'un par rapport à l'autre. Ils sont en outre de préférence chacun situés en position méta par rapport à R_1 .
- [0040] Le cycle aromatique Ar_1 peut en outre être substitué, sur un ou plusieurs de ses atomes formant le cycle non liés à R_1 , R_2 ou R_3 , notamment sur tous ces atomes non liés, par un ou plusieurs groupements, pouvant être identiques ou différents, choisis chacun parmi les groupements méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, ou cyclopropyle. Préférentiellement, Ar_1 n'est substitué sur aucun de ses atomes du cycle non liés à R_1 , R_2 ou R_3 .
- [0041] R_2 et R_3 sont de préférence identiques.
- [0042] Préférentiellement, dans la formule générale (I) :
- R_1 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₄- où R_4 représente un groupe méthyle,
 - et/ou Ar_1 représente un cycle aromatique, de préférence à 6 chaînons, non substitué,
 - et/ou R_2 et R_3 représentent chacun un radical alkyle linéaire comprenant 1, 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier un radical méthylène -CH₂-.

[0043] Au moins une, de préférence chaque, unité P1 des couches intermédiaires des dendrimères peut répondre à l'une des formules (Ia) à (Ie) suivantes :

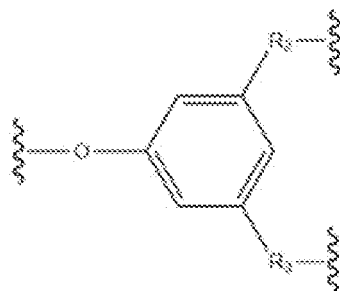
[0044] [Chem.7]



(Ia)

[0045] dans laquelle Ar_1 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué, et/ou R_2 et R_3 sont identiques et représentent de préférence un radical alkyle linéaire comprenant 1, 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier un radical méthylène,

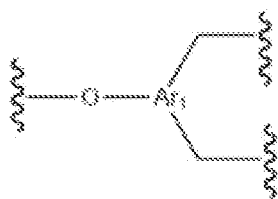
[0046] [Chem.8]



(Ib)

[0047] dans laquelle R_2 et R_3 sont identiques et représentent de préférence un radical alkyle linéaire comprenant 1, 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier un radical méthylène,

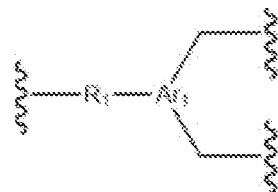
[0048] [Chem.9]



(Ic)

[0049] dans laquelle Ar_1 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

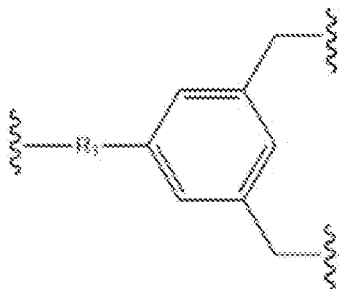
[0050] [Chem.10]



(Id)

[0051] dans laquelle R_1 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₄- où R représente un groupe méthyle, et/ou Ar₁ représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

[0052] [Chem.11]

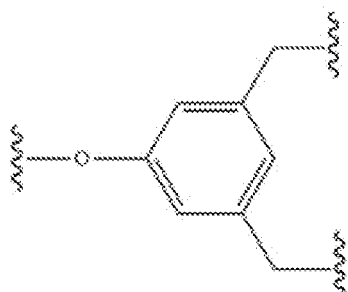


(Ie)

[0053] dans laquelle R_1 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₄- où R₄ représente un groupe méthyle.

[0054] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, des unités P1 des couches intermédiaires des dendrimères, de préférence l'ensemble des unités P1 des dendrimères, répondent à la formule (If) suivante :

[0055] [Chem.12]



(If).

[0056] La couche externe des dendrimères selon l'invention peut comprendre, en fonction du nombre de couches intermédiaires de ce dernier, et du nombre de groupements du noyau central P0 sur lesquels sont branchées des unités P1 de la première couche intermédiaire, de 4 à 64 unités P2. Elle comprend de préférence de 6 à 48, préférentiellement de 12 à 24, unités P2.

[0057] Ces unités P2 peuvent être différentes les unes des autres. Elles sont préférentiellement toutes identiques.

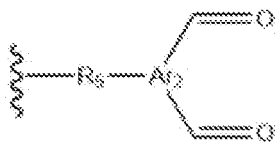
[0058] Une ou plusieurs, de préférence l'ensemble, des unités P2 du dendrimère selon l'invention peuvent répondre à l'une ou plusieurs des caractéristiques ci-après.

[0059] Le cycle aromatique Ar₂ peut être un hétérocycle, comprenant par exemple un ou

plusieurs atomes d'oxygène, azote et/ou soufre en lieu et place d'un ou plusieurs atomes de carbone formant le cycle. Il est de préférence uniquement constitué d'atomes de carbone.

- [0060] Les groupements R_5 , R_6 et R_7 peuvent être disposés à toute position les uns par rapport aux autres sur le cycle aromatique Ar_2 . Préférentiellement, ils ne sont pas situés sur des atomes adjacents du cycle, notamment en position ortho les uns par rapport aux autres dans le cas d'un cycle aromatique à 6 chaînons.
- [0061] Dans les modes de réalisation particuliers de l'invention dans lesquels Ar_2 représente un cycle aromatique à 6 chaînons, lorsque R_6 et R_7 sont tous deux différents d'un atome d'hydrogène, ils sont de préférence situés en position méta l'un par rapport à l'autre. Ils sont en outre de préférence chacun situés en position méta par rapport à R_5 . Lorsque l'un des groupements R_6 et R_7 représente un atome d'hydrogène, l'autre de ces groupements est de préférence situé en position para par rapport à R_5 .
- [0062] Le cycle aromatique Ar_2 peut en outre être substitué, sur un ou plusieurs de ses atomes du cycle non liés à R_5 , R_6 ou R_7 , ou même sur tous ces atomes, par un ou plusieurs groupements, pouvant être identiques ou différents, choisis chacun parmi les groupements méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle ou cyclopropyle. Préférentiellement, Ar_2 n'est substitué sur aucun de ses atomes du cycle non liés à R_5 , R_6 ou R_7 .
- [0063] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, R_6 et R_7 sont identiques. Dans des modes de réalisation particuliers alternatifs, ils sont différents, l'un d'entre eux représentant alors de préférence un atome d'hydrogène.
- [0064] Préférentiellement, dans la formule générale (II) :
- R_5 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, ou un groupement -NH- ou -NR₈ où R_8 représente un groupe méthyle,
 - et/ou Ar_2 représente un cycle aromatique, de préférence à 6 chaînons, non substitué,
 - et/ou R_6 et R_7 représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, -CH=O, -CH₂OH, -CH₂Cl, -OH, -SH, -CH₂-SH, -CO-OCH₃, -COOH, -NHR₉, -NR₁₂R₁₃, -O-R₉, -R₉-SO₂-R₁₀, -CN₃, -CNO₂, -P(O)(OR₉)OR₁₀ et -P(O)R₉R₁₀R₁₁, R_6 et R_7 ne représentant pas simultanément un atome d'hydrogène ; parmi les groupements fonctionnels ci-avant, le groupement aldéhyde -CH=O est particulièrement préféré dans le cadre d'une application du support fonctionnalisé à la fabrication de biopuces à molécules d'acide nucléique, en particulier à sondes d'acide désoxyribonucléique (ADN), pour sa capacité à réagir avec les fonctions amines.
- [0065] Au moins une, de préférence chaque, unité P2 de la couche externe des dendrimères peut répondre à l'une des formules (IIa) à (IIj) suivantes :

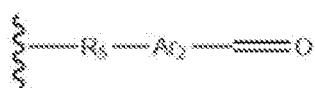
[0066] [Chem.13]



(IIa)

[0067] dans laquelle R_5 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupe méthyle, et/ou Ar_2 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

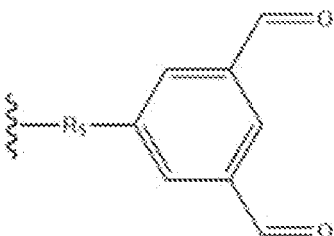
[0068] [Chem.14]



(IIb)

[0069] dans laquelle R_5 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupe méthyle, et/ou Ar_2 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

[0070] [Chem.15]



(IIc)

[0071] dans laquelle R_5 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupe méthyle,

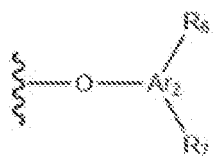
[0072] [Chem.16]



(IId)

[0073] dans laquelle R_5 représente de préférence un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupe méthyle,

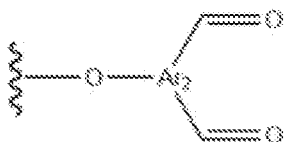
[0074] [Chem.17]



(IIe)

[0075] dans laquelle Ar_2 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué, et/ou R_6 et R_7 représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, $-CH=O$, $-CH_2OH$, $-CH_2Cl$, $-OH$, $-SH$, $-CH_2-SH$, $-CO-OCH_3$, $-COOH$, $-NHR_9$, $-NR_{12}R_{13}$, $-O-R_9$, $-R_9-SO_2-R_{10}$, $-CN_3$, $-CNO_2$, $-P(O)(OR_9)OR_{10}$ et $-P(O)R_9R_{10}R_{11}$, R_6 et R_7 ne représentant pas simultanément un atome d'hydrogène,

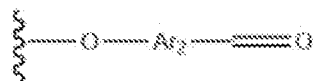
[0076] [Chem.18]



(IIf)

[0077] dans laquelle Ar_2 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

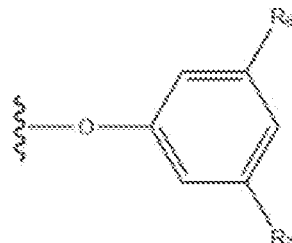
[0078] [Chem.19]



(IIg)

[0079] dans laquelle Ar_2 représente de préférence un cycle aromatique à 6 ou 8 chaînons non substitué,

[0080] [Chem.20]

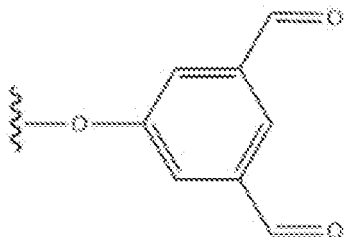


(IIh)

[0081] dans laquelle R_6 et R_7 représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, $-CH=O$, $-CH_2OH$, $-CH_2Cl$, $-OH$, $-SH$, $-CH_2-SH$, $-CO-OCH_3$, $-COOH$, $-NHR_9$, $-NR_{12}R_{13}$, $-O-R_9$, $-R_9-SO_2-R_{10}$, $-CN_3$, $-CNO_2$, $-P(O)(OR_9)OR_{10}$ et $-P(O)R_9R_{10}R_{11}$, R_6 et R_7 ne représentant pas simultanément un

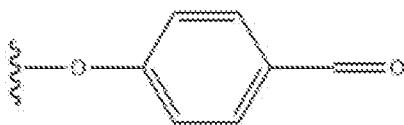
atome d'hydrogène,

[0082] [Chem.21]



(IIi)

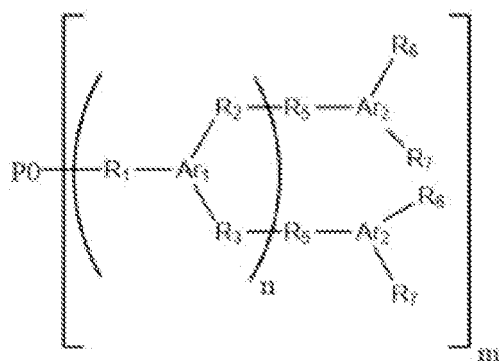
[0083] [Chem.22]



(IIj)

[0084] Les dendrimères selon l'invention répondent de préférence à la formule générale (IV) suivante :

[0085] [Chem.23]



(IV)

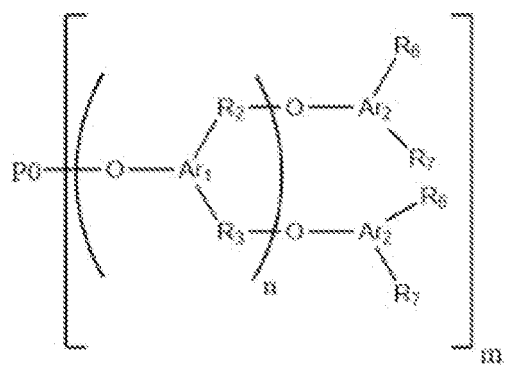
[0086] dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2, notamment compris entre 2 et 8 et par exemple égal à 6,

P0 représente le noyau central des dendrimères,

et R₁, R₂, R₃, R₅, R₆, R₇, Ar₁, Ar₂ et n sont tels que définis ci-avant.

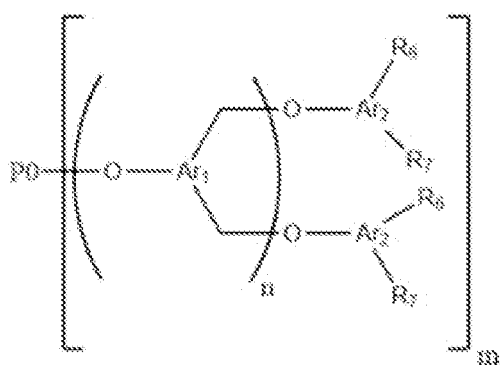
[0087] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, les dendrimères répondent à l'une des formules (IVa) à (IVf) suivantes :

[0088] [Chem.24]



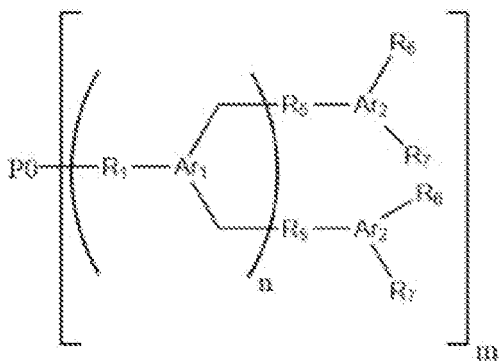
(IVa)

[0089] [Chem.25]



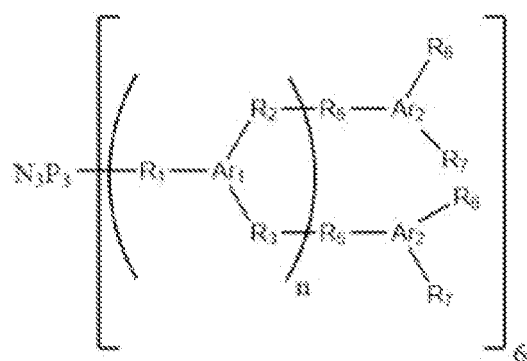
(IVb)

[0090] [Chem.26]



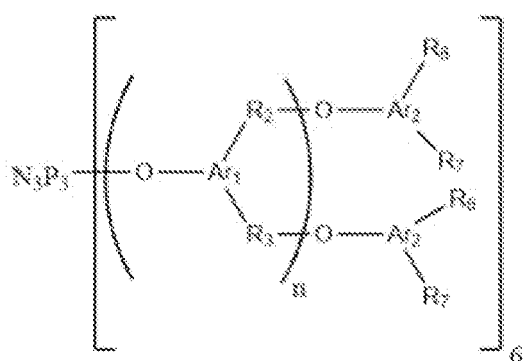
(IVc)

[0091] [Chem.27]



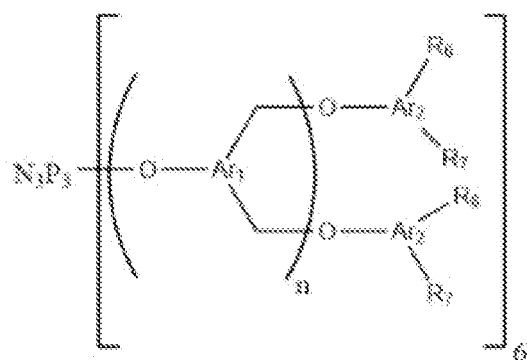
(IVd)

[0092] [Chem.28]



(IVe)

[0093] [Chem.29]

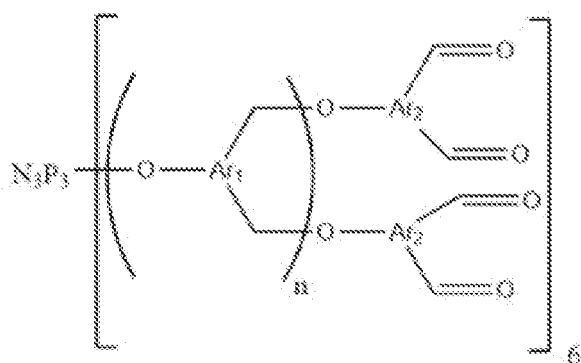


(IVf)

[0094] dans lesquelles P0, R₁, R₂, R₃, R₅, R₆, R₇, Ar₁, Ar₂, m et n sont tels que définis ci-avant.

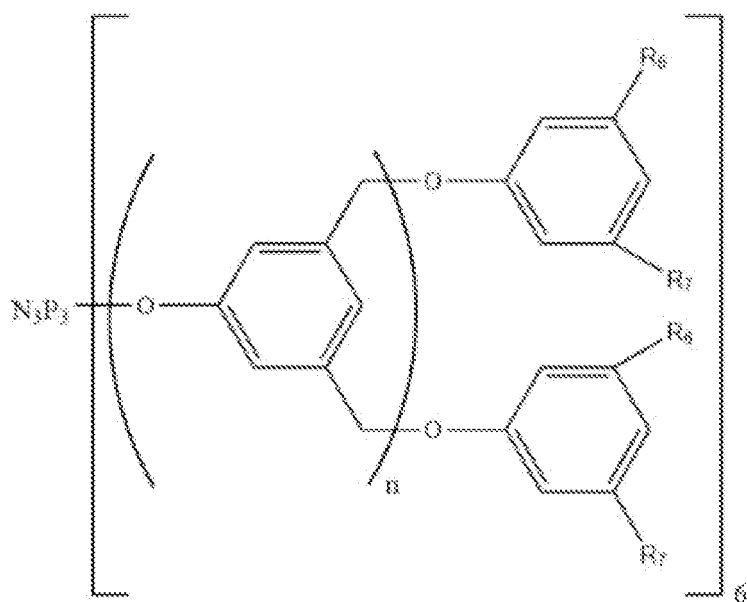
[0095] Les dendrimères selon l'invention peuvent notamment répondre aux formules (IVg) ou (VIh) :

[0096] [Chem.30]



(IVg)

[0097] [Chem.31]

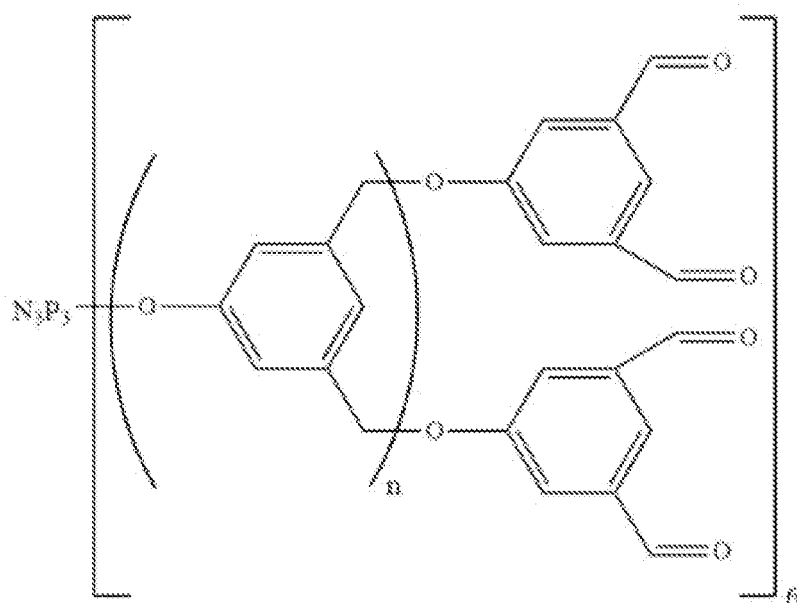


(IVh)

[0098] dans lesquelles n , Ar_1 , Ar_2 , R_6 et R_7 sont tels que défini ci-avant.

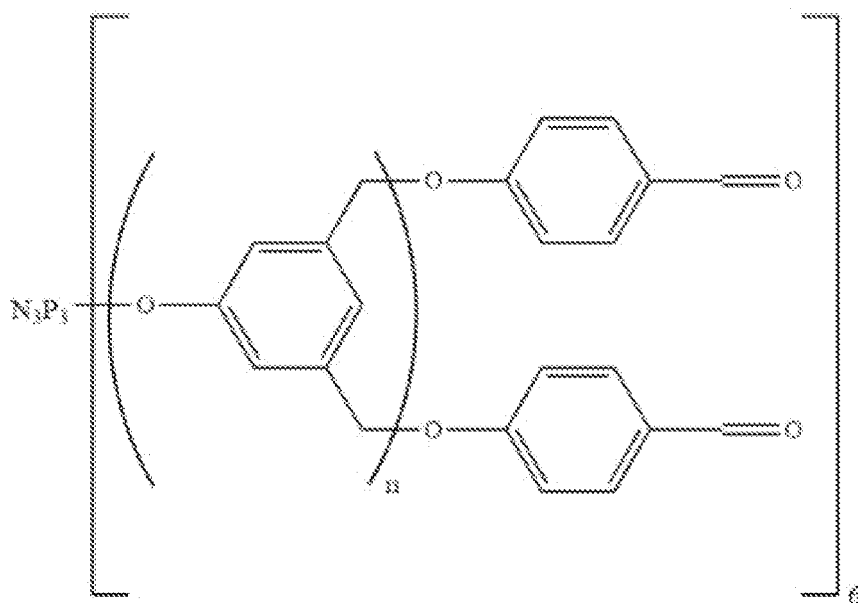
[0099] Des dendrimères particuliers selon l'invention répondent à la formule (IVi) ou à la formule (IVj) :

[0100] [Chem.32]



(IVi)

[0101] [Chem.33]



(IVj)

[0102] dans lesquelles n est compris entre 1 et 4, et est en particulier égal à 2 ou 3.

[0103] Les dendrimères selon l'invention peuvent être synthétisés de toute façon connue de la personne du métier, notamment par répétition d'une même séquence réactionnelle permettant l'obtention d'une nouvelle génération à la fin de chaque séquence. En particulier, les dendrimères selon l'invention peuvent être synthétisés selon la méthode présentée dans la publication suivante : Karpus *et al.*, Crown Macromolecular Derivatives: Stepwise Design of New Types of Polyfunctionalized Phosphorus Dendrimers. *The Journal of Organic Chemistry*, 2022, vol. 87, no 5, p. 3433-3441.

- [0104] Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un support solide ou semi-solide selon l'invention, qui comprend une étape de fixation, en particulier par liaison covalente, de dendrimères tel que définis ci-avant sur ladite surface du support.
- [0105] Cette étape de fixation peut être réalisée par réaction de groupements fonctionnels des dendrimères avec des fonctions chimiques portées par la surface du support qui sont aptes à réagir avec ces groupements fonctionnels pour former une liaison covalente.
- [0106] Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, les groupements fonctionnels libres des dendrimères sont des groupements aldéhyde, et la surface du support sur laquelle les dendrimères doivent être fixés comporte des fonctions amine. L'étape de fixation des dendrimères sur le support solide ou semi-solide comprend alors de préférence l'immersion de la surface du support portant les fonctions amine dans un bain contenant les dendrimères dans un solvant, pendant une durée de préférence comprise entre 10 minutes et 24 heures, préférentiellement comprise entre 1 et 12 heures et préférentiellement encore comprise entre 2 et 8 heures. Le solvant mis en œuvre est de préférence un solvant aprotique, préférentiellement polaire tel que le tétrahydrofurane.
- [0107] Le procédé selon l'invention peut comprendre, si nécessaire, une étape préalable de fonctionnalisation de la surface du support pour lui apporter les fonctions requises. Il entre dans les compétences de l'homme du métier d'en déterminer les conditions opératoires, et les réactifs à mettre en œuvre, en fonction de chaque combinaison particulière de matériau formant le support solide et de groupements fonctionnels portés par les dendrimères sur leur périphérie. A titre d'exemple, lorsque le matériau constituant le support est le verre, et les groupements fonctionnels portés par les dendrimères sont des fonctions aldéhyde, cette étape de fonctionnalisation peut être réalisée par une réaction de silanisation, réalisée de manière classique en elle-même, au moyen d'un actif de silanisation comportant des fonctions amine aptes à réagir avec les groupements fonctionnels des dendrimères.
- [0108] Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, lorsque la surface du support comporte déjà des fonctions aptes à réagir avec des groupements fonctionnels des dendrimères pour former une liaison covalente, par exemple lorsque la surface du support est formée en or et que les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions thiol, l'étape de fixation des dendrimères sur la surface du support est réalisée directement, sans étape préalable de fonctionnalisation spécifique de la surface du support.
- [0109] Le procédé selon l'invention peut en outre comporter, en étape initiale, une étape optionnelle de nettoyage de la surface du support à fonctionnaliser par les dendrimères.

Cette étape de nettoyage peut être réalisée de toute manière classique en elle-même, par exemple au moyen d'une solution alcaline, notamment à base d'hydroxyde de sodium. Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, elle est réalisée par immersion de la surface du support dans une telle solution alcaline. L'étape de nettoyage peut optionnellement être suivie d'une étape de séchage, par exemple sous courant d'azote ou par centrifugation.

- [0110] La quantité de dendrimères déposée sur le support peut notamment être comprise entre 0,1 et 1000 μg par cm^2 de support, par exemple être environ égale à 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- [0111] Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'un support solide ou semi-solide selon l'invention pour la fabrication d'une biopuce. L'invention s'exprime également à cet égard dans les termes d'un procédé de fabrication d'une biopuce mettant en œuvre un support solide ou semi-solide selon l'invention.
- [0112] Dans toute la présente description, on entend par biopuce, de manière classique en elle-même, tout système, de préférence miniaturisé, comportant un support sur lequel sont immobilisées, notamment de façon covalente, des molécules, dites molécules sondes, chacune à un endroit précis du support, pour l'analyse d'interactions de ces molécules sondes avec des molécules cibles en solution.
- [0113] Selon la présente invention, la fabrication de la biopuce comprend la liaison covalente d'au moins une molécule, dite molécule sonde, de préférence d'une pluralité de molécules sondes, sur des groupements fonctionnels libres des dendrimères greffés sur la surface du support.
- [0114] Les molécules sondes sont choisies en fonction des molécules cibles visées. Elles peuvent être de toute nature ou origine. Il peut notamment s'agir de molécules d'acide nucléique, de peptides, de protéines, de polysaccharides, de glucides, de glycosides, notamment aminés, de lipides, etc.
- [0115] En particulier, les molécules sondes peuvent consister en des molécules d'acide nucléique simple-brin ou double-brins, d'origine naturelle ou synthétique, par exemple consister en des aptamères, ou en des amplicons obtenus par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), pouvant présenter toute taille, par exemple jusqu'à 500 nucléotides. Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, les molécules d'acide nucléique sont des oligonucléotides obtenus par synthèse chimique, par des techniques connues de l'homme du métier, présentant de préférence une taille comprise entre 15 et 50 nucléotides.
- [0116] Les molécules sondes peuvent autrement consister en ou comprendre des peptides et/ou pseudo-peptides. Préférentiellement, ces peptides sont choisis pour posséder une fonction amine libre. Des peptides comprenant un résidu lysine, arginine, glutamine, asparagine et/ou histidine sont ainsi particulièrement préférés dans le cadre de l'invention.

- [0117] Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, les groupements fonctionnels libres des dendrimères sont des groupements aldéhyde, et la ou les molécules sondes contiennent au moins une fonction amine.
- [0118] La molécule sonde peut avoir été préalablement modifiée pour y introduire une fonction apte à réagir avec des groupements fonctionnels libres des dendrimères. Par exemple, la molécule sonde peut avoir été modifiée pour y introduire une fonction amine apte à réagir avec des groupements aldéhydes libres situés en périphérie des dendrimères.
- [0119] La fabrication de la biopuce comprend notamment une étape d'adressage ordonné des molécules sondes sur la surface du support fonctionnalisé selon l'invention, suivant un agencement géométrique donné, pour leur liaison avec les dendrimères qui y sont immobilisés, cette étape pouvant être réalisée de toute manière conventionnelle pour l'homme du métier. L'agencement réalisé est de préférence adapté au mode de lecture de la biopuce envisagé. Par exemple, pour les biopuces à fluorescence, les molécules sondes peuvent être adressées sur la surface du support au moyen d'un robot à aiguille ou à jet d'encre. Dans ce cas, les motifs de dépôt sont des spots ronds, dont la taille est compatible avec la résolution du scanner de lecture de la fluorescence. Dans le cas d'une détection sans marquage par fluorescence, par exemple par diffraction de la lumière, les molécules sondes sont de préférence ordonnées sur le support fonctionnalisé selon des motifs dits diffractants, dont la taille et la forme sont dépendantes du système de lecture de la diffraction. L'adressage des molécules sondes peut alors par exemple être réalisé par une technique d'impression par microcontact. L'ensemble des techniques ci-avant sont bien connues de l'homme du métier, qui sait comment et au moyen de quels dispositifs les mettre en œuvre.
- [0120] La mise en contact entre le support fonctionnalisé et les molécules sondes est maintenue pendant un temps suffisant, et réalisée dans des conditions adéquates, pour permettre le greffage des molécules sondes sur les dendrimères.
- [0121] Cette mise en contact peut être suivie d'une étape de lavage, afin d'éliminer toutes les molécules non liées, et d'une étape de séchage optionnelle, par exemple sous courant d'azote ou par centrifugation.
- [0122] Un autre objet de l'invention est une biopuce, qui comporte un support solide ou semi-solide selon l'invention et au moins une molécule, dite molécule sonde, de préférence une pluralité de molécules sondes, fixée(s) de manière covalente à des groupements fonctionnels libres des dendrimères du support.
- [0123] Les molécules sondes peuvent répondre à l'une ou plusieurs des caractéristiques décrites ci-avant en référence à l'utilisation d'un support fonctionnalisé selon l'invention pour la fabrication d'une biopuce.
- [0124] La biopuce selon l'invention peut notamment être une biopuce à ADN ou une

biopuce à ARN. Il peut notamment s'agir d'une puce à ADN de type génomique ou transcriptomique comprenant respectivement des fragments d'ADN obtenus par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) ou des retranscrits d'ADN.

- [0125] La biopuce objet de la présente invention peut être utilisée pour la recherche, dans un milieu, d'une molécule cible particulière avec laquelle la molécule sonde est apte à interagir, et trouver application dans de multiples domaines.
- [0126] Ainsi, un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'une biopuce selon l'invention pour la détection, dans un échantillon, d'une molécule cible avec laquelle la molécule sonde est apte à interagir de manière spécifique.
- [0127] Cet échantillon peut être de tout type. Il peut notamment s'agir d'un échantillon biologique, en particulier issu d'un individu dans un domaine d'application avantageux de la biopuce selon l'invention qu'est le diagnostic médical. Dans un tel domaine d'application, la molécule sonde peut notamment être :
 - une sonde nucléotidique, par exemple d'ADN, pour l'analyse d'interactions ADN-ADN et/ou ADN-ARN, par exemple pour la détection d'ADN spécifique d'un pathogène ou pour détecter des mutations d'un gène prédisposant les patients à un certain type de maladie ;
 - une sonde peptidique, pour l'analyse d'interactions protéine-protéine et/ou protéine-anticorps ;
 - un aptamère, pour l'analyse de l'interaction protéine-ADN ;
 - un glycoside aminé, pour l'analyse glycomique.
- [0128] Tout autre domaine d'application d'une biopuce selon l'invention entre également dans le cadre de l'invention.
- [0129] La détection de l'interaction entre la molécule sonde et la molécule cible peut être réalisée par toute technique classique en elle-même.
- [0130] Par exemple, la molécule cible peut être préalablement marquée par un marqueur détectable classique en lui-même, notamment par un marqueur fluorescent tel qu'un fluorophore, ou par une étiquette présentant une forte affinité de liaison avec un partenaire lui-même lié à un marqueur détectable, de sorte à générer un signal détectable et le cas échéant quantifiable, notamment un signal de fluorescence. Après mise en contact du support sur lequel est immobilisée la molécule sonde avec le milieu susceptible de contenir la molécule cible à détecter, et le cas échéant mise en présence du partenaire lié au marqueur détectable, l'interaction spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible est alors simplement déterminée par excitation du marqueur détectable qui s'est éventuellement assemblé sur le support, puis détection du signal, notamment de fluorescence, alors éventuellement réémis par le marqueur.
- [0131] La détection de l'interaction de la molécule sonde avec la molécule cible peut autrement par exemple être réalisée par une technique basée sur le principe des réseaux

de diffraction de la lumière.

[0132] Les caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront plus clairement à la lumière des exemples de mise en œuvre ci-après, fournis à simple titre illustratif et nullement limitatifs de l'invention, avec l'appui des figures 1 à 7, dans lesquelles :

[0133] [Fig.1] La [Fig.1] montre les étapes d'une voie de synthèse d'un premier précurseur de dendrimères conformes à l'invention.

[0134] [Fig.2] La [Fig.2] montre les étapes d'une voie de synthèse d'un deuxième précurseur de dendrimères conformes à l'invention.

[0135] [Fig.3] La [Fig.3] montre les étapes d'une voie de synthèse d'un premier dendrimère conforme à l'invention D1.

[0136] [Fig.4] La [Fig.4] montre les étapes d'une voie de synthèse d'un deuxième dendrimère conforme à l'invention D2.

[0137] [Fig.5] La [Fig.5] montre une image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB), d'un spot de détection obtenu dans une expérience de détection d'un oligonucléotide cible dans un milieu liquide, au moyen d'une biopuce utilisant, pour la fonctionnalisation du support, un dendrimère phosphoré de l'art antérieur (« 96 CHO ») et, en tant que sonde immobilisée sur ledit dendrimère, un oligonucléotide complémentaire de l'oligonucléotide cible, la détection étant réalisée par colorimétrie.

[0138] [Fig.6] La [Fig.6] montre une image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB), d'un spot de détection obtenu dans une expérience similaire à celle de la [Fig.5], mais réalisée au moyen d'une biopuce utilisant, pour la fonctionnalisation du support, un dendrimère conforme à l'invention (« D1 »).

[0139] [Fig.7] La [Fig.7] montre un histogramme représentant les intensités de détection obtenues dans le cadre de la détection de molécules cibles par différentes sondes bactériennes fixées sur une biopuce comprenant un dendrimère de l'art antérieur (« 96 CHO ») d'une part, et une biopuce comprenant un dendrimère D1 conforme à l'invention d'autre part. Les molécules cibles sont 5 amplicons obtenus à partir d'un échantillon biologique par la technique PCR visant l'amplification de fragments d'ADN spécifiques de *Proteus mirabilis* et de fragments spécifiques d'*Escherichia coli*, dont les sondes bactériennes sont complémentaires. Les sondes 12 et 13 détectent de l'ADN de *Proteus mirabilis*, les sondes 10 et 11 détectent de l'ADN d'*Escherichia coli* et les sondes 68P, 71P et 72P ciblent de l'ADN des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* en général, dont font partie les espèces *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli*.

[0140] Dans les exemples ci-après, les différentes étapes de synthèse s'effectuent dans des solvants exempts d'humidité et sous atmosphère d'Argon.

[0141] **EXEMPLE 1 : Synthèse de précurseurs de dendrimères conformes à l'invention**
Précurseur 8

[0142] Les différentes étapes de synthèse d'un premier précurseur de dendrimères selon l'invention (composé 8) sont détaillées sur la [Fig.1].

[0143] Synthèse du composé 3

Un mélange d'hexachlorocyclotriphosphazène 1 (12,00 g, 34,5 mmol, 1 éq.) et de diméthyl 5-hydroxyisophthalate (44,26 g, 211 mmol, 6 éq.) est dissous dans 750 mL d'acétone. Du carbonate de potassium (K_2CO_3) (57,38 g, 415 mmol, 12 éq.) est ajouté à la solution sous une agitation vigoureuse. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Les solvants volatils sont retirés sous vide puis le mélange est dissous dans 500 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) et 500 mL de solution de soude (NaOH) 1M. Le mélange est extrait avec 3 x 500 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2). Les fractions organiques sont lavées avec de l'eau puis séchées avec du sulfate de sodium (Na_2SO_4). Après retrait du solvant, le composé 3 pur est obtenu sous la forme d'un solide blanc (45,95 g, 33,1 mmol).

[0144] Synthèse des composés 4 et 7

Au composé 3 (ou 6) (7,95 mmol) dans 550 mL de tétrahydrofurane (THF), le complexe borane diméthyl sulfide (2,75 éq. par groupe CO_2Me) est ajouté lentement et le mélange obtenu est chauffé à reflux avec contrôle de la conversion par RMN 1H and ^{31}P (dans CD_3OD). Après réaction complète (168h) les solvants sont retirés sous vide afin d'obtenir un solide blanc séché sous vide pendant 1 nuit. Le produit est ensuite dissous dans 600 mL de méthanol (MeOH) et agité pendant 24 h. Après filtration et concentration de la solution, une huile incolore est obtenue. Ce produit est alors chauffé à reflux dans 100 mL d'acétone puis filtré pour obtenir le composé 4 (ou 7) sous la forme d'un solide blanc.

[0145] Synthèse des composés 5 et 8

Au composé 4 (ou 7) (5,35 mmol) dans 250 mL de tétrahydrofurane (THF), la triphénylphosphine (33,68 g, 128,4 mmol, 2 éq. par groupe CH_2OH) et l'hexachloroéthane (30,40 g, 128,4 mmol, 2 éq. par groupe CH_2OH) sont ajoutés. Le mélange obtenu est agité à température ambiante avec contrôle de la conversion par RMN 1H and ^{31}P . Après réaction complète (48h), les solvants sont retirés sous vide et le mélange est purifié par chromatographie flash sur silice (SiO_2) avec un mélange dichlorométhane (CH_2Cl_2)/Hexane = 5/1 comme éluant pour obtenir le composé 5 (ou 8) sous la forme d'un produit solide blanc.

[0146] Synthèse du composé 6

Un mélange du composé 5 (1,75 mmol) et de diméthyl 5-hydroxyisophthalate (1,03 éq. par groupe CH_2Cl) est dissous dans 250 mL d'acétonitrile (CH_3CN). Du carbonate de potassium (K_2CO_3) (2,0 éq. par groupe CH_2Cl) est ajouté à la solution sous une agitation vigoureuse. Le mélange obtenu est chauffé à reflux avec contrôle de la conversion par RMN 1H and ^{31}P . Après réaction complète (16h), les solvants volatils

sont retirés sous vide puis le mélange est dissous dans 300 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) et 300 mL de solution de soude (NaOH) 1M. Le mélange est extrait avec 3 x 150 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2). Les fractions organiques sont lavées avec de l'eau et séchées avec du sulfate de sodium (Na_2SO_4). Après retrait du solvant, le composé **6** pur est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

[0147] Précurseur 13

Les différentes étapes de synthèse d'un deuxième précurseur de dendrimères selon l'invention (composé 13), destiné à réagir avec le composé 8 ci-dessus pour former des dendrimères selon l'invention, sont détaillées sur la [Fig.2].

Une solution de diméthyl 5-hydroxyisophthalate **2** (8,41 g, 40 mmol) dans 300 mL de THF est refroidie à -10°C . A cette température, de l'aluminohydruure de lithium (LiAlH_4) est ajouté goutte à goutte pendant 35 min. Le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 16 h puis refroidi dans un bain de glace avant d'être bloqué par une solution contenant 20 mL d'acétate d'éthyle (EtOAc), 10 mL d'éthanol (EtOH) et 56 mL d'acide sulfurique à 10 %. Le mélange est ensuite dilué avec 200 mL de tétrahydrofurane (THF) et 100 g de sulfate de sodium anhydre sont ajoutés. Après 2 h à température ambiante, le mélange est filtré puis concentré afin d'obtenir une huile jaune pâle. Ce produit est alors chauffé à reflux dans 50 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) puis filtré et lavé avec 2 fois 50 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) pour obtenir le (5-hydroxy-1,3-phénylène)diméthanol **12** sous la forme d'un solide blanc (5,71 g, 37 mmol). A une solution de (5-hydroxy-1,3-phénylène)diméthanol **12** (4,02 g, 26 mmol, 1 éq.) dans 240 mL d'un mélange tétrahydrofurane/dichlorométhane ($\text{THF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) 1/1 sont ajoutés de la silice (SiO_2) (16,0 g) et du chlorochromate de pyridinium (PCC) (16,9 g, 78 mmol, 3 éq.). Le mélange obtenu est agité vigoureusement pendant 3 h à température ambiante puis de la silice SiO_2 (16,0 g) est ajoutée avant de concentrer le mélange puis de le purifier sur chromatographie flash sur silice (SiO_2) (300 mL) avec un mélange acétate d'éthyle (EtOAc)/Hexane = 1/1 comme éluant ($R_f = 0,35$). L'hydroxyisophthalaldéhyde **13** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (2,73 g, 18 mmol).

[0148] EXEMPLE 2 : Synthèse d'un premier dendrimère conforme à l'invention (« D1 ») à partir des précurseurs obtenus dans l'exemple 1

[0149] Le schéma montré sur la [Fig.3] décrit la synthèse d'un premier exemple de dendrimère conforme à l'invention, appelé D1, phosphoré uniquement à cœur et présentant 48 fonctions aldéhydes en surface.

Un mélange du composé **8** (0,2 mmol) et de 5-hydroxyisophthalaldéhyde **13** (1,05 éq. par groupe CH_2Cl) est dissous dans 100 mL d'acétonitrile (CH_3CN). La solution est agitée vigoureusement et du carbonate de potassium (K_2CO_3) (2,0 éq. par groupe CH_2Cl) est ajouté. Le mélange obtenu est chauffé à reflux avec contrôle de la conversion

par RMN ^1H and ^{31}P . Après réaction complète (120 h), le mélange est refroidi à température ambiante puis filtré. Le dendrimère **16** (D1), obtenu sous forme de solide blanc, est lavé avec de l'eau puis séché sous vide.

[0150] EXEMPLE 3 : Synthèse d'un deuxième dendrimère conforme à l'invention (« D2 ») à partir des précurseurs obtenus dans l'exemple 1

[0151] Le schéma montré sur la [Fig.4] décrit la synthèse d'un second exemple de dendrimère conforme à l'invention, appelé D2, phosphoré uniquement à cœur et présentant 24 fonctions aldéhydes en surface.

Un mélange du composé **8** (0,8 mmol) et de 4-hydroxybenzaldéhyde **17** (1,05 éq. par groupe CH_2Cl) est dissous dans 150 mL d'acétonitrile (CH_3CN). La solution est agitée vigoureusement et du carbonate de potassium (K_2CO_3) (2,0 éq. par groupe CH_2Cl) est ajouté. Le mélange obtenu est chauffé à reflux avec contrôle de la conversion par RMN ^1H and ^{31}P . Après réaction complète (24 h), le mélange est refroidi à température ambiante puis filtré. Le mélange solide est dissous dans 300 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) et 500 mL d'eau et extrait avec 3 fois 150 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2). Les fractions organiques sont lavées avec de l'eau et séchées avec du sulfate de sodium (Na_2SO_4). Le produit pur **19** (D2) est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

[0152] EXEMPLE 4 : Protocole de fabrication de biopuces à ADN

[0153] 1/ Préparation d'un support solide constitué par une lame de verre fonctionnalisée par des dendrimères à fonctions aldéhyde libres en surface

[0154] a/ 1^{ère} Etape : Nettoyage des lames de verre

Des lames de verre commerciales (Gold Seal, EMS) sont placées sur des portoirs et sont immergées dans une solution alcaline de lavage constituée de 300 g de soude dans 1,2 L d'eau milliQ et de 1,8 l d'éthanol à 96%. Les lames sont agitées pendant 2h à température ambiante à l'aide d'un agitateur orbital à une vitesse de 30 rotations par minute (Heidolph Instruments Polymax 1040). Elles sont ensuite abondamment rincées avec de l'eau milliQ (4 lavages de 5 min chacun) et séchées sous courant d'azote ou par centrifugation.

[0155] b/ 2^{ème} étape : Silanisation

Les lames de verre ainsi nettoyées sont immergées dans une solution de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, Merck) à 10 % dans l'éthanol à 96% et sont placées sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite laissées pendant 30 min à l'air libre, rincées avec de l'eau milliQ (2 lavages de 5 min chacun et 1 lavage de 2 min avec sonication) puis avec de l'éthanol à 96 % (1 lavage de 5 min) et enfin avec de l'éthanol à 99% (1 lavage de 5 min) avant d'être séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. Elles sont ensuite placées pendant 3 h à une température de 120 °C.

[0156] c/ 3^{ème} étape : Fonctionnalisation avec les dendrimères

Les lames silanisées sont placées dans une solution de dendrimères D1 ou D2 (58 μ M dans du tétrahydrofurane) pendant 6 h sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite lavées avec du tétrahydrofurane (1 lavage de 5 min) puis avec de l'éthanol à 96 % (1 lavage de 5 min) et enfin avec de l'éthanol à 99% (1 lavage de 5 min) avant d'être séchées sous courant d'azote ou par centrifugation.

[0157] On obtient ainsi des supports solides fonctionnalisés par des dendrimères à fonctions aldéhydes. Ces supports fonctionnalisés peuvent ensuite être utilisés pour la fabrication de puces, par immobilisation de molécules sondes sur les dendrimères.

[0158] 2/ Fabrication de la biopuce

L'oligonucléotide utilisé en tant que molécule sonde (CIH_ol) est modifié à son extrémité 5' par un bras à 6 atomes de carbones terminé par une fonction amine, de formule $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$ (Eurogentec, Belgique), ce qui permet la réaction avec les fonctions aldéhydes portées par les dendrimères. Il présente la séquence nucléotidique :

5' $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-AATATGTTTCCGGTCGTGTC}$ 3' (SEQ ID No :1)

Sur les supports fonctionnalisés par les dendrimères, les 100 μ M d'oligonucléotide sont dilués 2 fois dans un tampon phosphate 0,3 M (pH 9) et déposés sur les supports fonctionnalisés par les dendrimères en utilisant le robot sciFLEXARRAYER (Scienion, Allemagne). Le volume déposé est de 600 pL. Après dépôt, les lames sont laissées pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4 , 1,74 g/L) (étape de réduction des fonctions imines) et y sont laissées pendant 30 min à température ambiante. Elles sont rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 min chacun) et sont séchées sous courant d'azote ou par centrifugation.

[0159] EXEMPLE 5 : Protocole d'hybridation de la molécule cible sur la molécule sonde

[0160] La solution utilisée lors de l'étape d'hybridation est composée de :

- Solution de Denhardt avec 1 % de Ficoll (400) 1 % de polyvinylpyrrolidone et 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA),
- Citrate de solution saline-sodium (SSC) 2,5X,
- ADN de sperme de saumon (100 μ g/mL),
- Oligonucléotide cible : oligonucléotide complémentaire de la molécule sonde

CIH_ol avec une biotine à l'extrémité 5', de séquence nucléotidique :

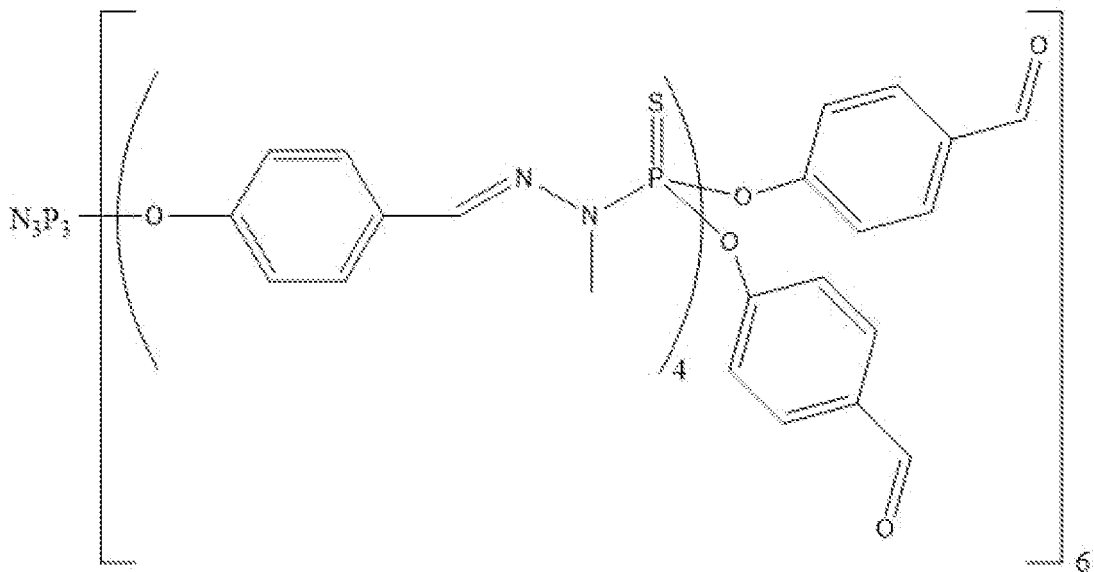
5' BIOTEG-GACACGACCGGAAACATATT 3' (SEQ ID No : 2) (Integrated DNA Technology Inc., dans laquelle BIO représente la biotine, et TEG représente un espaceur triéthylèneglycol disposé entre la biotine et la séquence nucléotidique.

[0161] La cible marquée est hybridée sur la biopuce de manière automatisée en utilisant un robot Microlab Starlet (Hamilton) contrôlé par le logiciel VENUS 4.5. L'automate est équipé d'un module de chauffage et agitation Hamilton Heater Shaker (HHS), d'un module de chauffage et refroidissement Hamilton Heater Cooler (HHC), d'un bloc

chauffant HeatPAC (Inheco) à plage de température de l'ambiante à 135 °C, d'un aimant NucleoMag SEP (Macherey-Nagel®) et d'une hotte HEPA (Noroit).

- [0162] Les conditions pratiques d'hybridation de l'oligonucléotide cible sur l'oligonucléotide sonde immobilisé sur les dendrimères sont les suivantes :
- dépôt de 115 µL de tampon d'hybridation contenant l'oligonucléotide cible marqué sur la biopuce,
 - chauffage de la biopuce à 60 °C et 250 tr/min pendant 30 min,
 - retrait du liquide et lavage avec 200 µL de solution de lavage (PBS 1X),
 - ajout de 100 µL de solution de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP-Streptavidin), solution commerciale (référence PIERN504, Thermo Scientific) diluée au 400^{ème}.
 - incubation pendant 20 min à l'abri de la lumière,
 - retrait du liquide et 3 lavages avec 200 µL de solution de lavage 2 (PBS 1X, 0,05% Tween®-20) ,
 - ajout de 100 µL de substrat sciCOLOR T3 (Scienion),
 - incubation pendant 20 min à l'abri de la lumière,
 - retrait du liquide et séchage de la lame à 50 °C pendant 5 min.
- [0163] EXEMPLE 6 : Protocole de détection et acquisition des données
- [0164] La biopuce est lue en utilisant le scanner colorimétrique sciREADER CL2 (Scienion). L'intensité de chaque spot est mesurée en soustrayant le bruit de fond environnant. La taille des spots est également mesurée.
- [0165] EXEMPLE 7 : Tests de comparaison des spots de détection entre un dendrimère proposé par l'art antérieur et les dendrimères conformes à l'invention
- [0166] 1/ Test 1 : Comparaison de l'intensité des spots de détection issus de l'hybridation d'une cible oligonucléotidique marquée et d'une sonde complémentaire portée par une biopuce comprenant un dendrimère proposé par l'art antérieur (« 96 CHO ») ou par des biopuces comprenant des dendrimères conformes à l'invention D1 et D2
- [0167] Le dendrimère proposé par l'art antérieur utilisé à titre comparatif dans cet exemple, nommé « 96 CHO », répond à la formule suivante :

[0168] [Chem.34]



[0169] Ce dendrimère peut par exemple être préparé comme décrit dans la demande de brevet FR2838737A1.

[0170] Une biopuce à base de ce dendrimère est préparée comme décrit dans l'exemple 4 ci-avant. Cette biopuce est soumise aux protocoles opératoires des exemples 5 et 6 ci-avant.

[0171] Les résultats obtenus, en termes de valeur médiane de l'intensité des spots et de coefficient de variation (CV) médian, sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

[0172] [Tableaux1]

	96 CHO	D1	D2
Intensité médiane	117,5	159,4	135,6
CV médian (%)	17	5	11,6

[0173] Tableau 1 - Valeur médiane de l'intensité des spots et coefficient de variation (CV) médian

[0174] Ces résultats montrent que tant D1 que D2 sont plus performants que le dendrimère 96 CHO de l'art antérieur. L'hybridation entre les molécules sondes et les molécules cibles sur les biopuces confectionnées avec D1 et D2 conduit en effet à un rapport signal sur bruit plus important, ainsi qu'à une dispersion du signal moindre que celles confectionnées avec le dendrimère 96 CHO.

[0175] Les biopuces ont par ailleurs été analysées par microscopie électronique à balayage. Les images obtenues sont montrées respectivement sur la [Fig.5] pour le dendrimère de l'art antérieur 96 CHO et la [Fig.6] pour le dendrimère conforme à l'invention D1. Ces images montrent l'obtention d'un spot de détection beaucoup plus rond sur la biopuce à base de D1. D1 a en outre été beaucoup plus simple à produire que 96 CHO (le temps

de production étant environ 10 fois moins long, ce à quoi s'ajoutent une simplification de la purification ainsi qu'une augmentation des rendements de synthèse par rapport à la préparation des dendrimères 96 CHO).

- [0176] 2/ Test 2 : Comparaison de l'intensité des spots de détection issus de l'hybridation d'oligonucléotides cibles marqués obtenus par amplification PCR d'un échantillon d'ADN de bactéries avec des sondes complémentaires immobilisées sur une biopuce comprenant un dendrimère proposé par l'art antérieur (« 96 CHO ») ou sur une biopuce comprenant un dendrimère conforme à l'invention D1
- [0177] Afin d'obtenir les oligonucléotides cibles marqués, un échantillon clinique comprenant les microorganismes *Proteus mirabilis* à une concentration de 10^4 UFC/mL et *Escherichia coli* à une concentration de 10^4 UFC/mL, provenant du Centre de Biologie Médicale (CBM) de Muret, a été utilisé.
- [0178] L'ADN de l'échantillon biologique a été extrait avec le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. 500 µL ont été utilisés pour l'extraction. Après centrifugation 10 min à 3000 g, le culot a été suspendu à nouveau dans 180 µL de tampon de lyse (lysozyme 40 mg/mL dans 20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 2 mM Sodium EDTA, 1,2% Triton®X-100) et incubé à 37°C pendant 1h.
- [0179] Une PCR multiplexe visant à amplifier les amplicons des gènes cibles représentatifs des espèces microbiennes présentes dans l'échantillon a ensuite été réalisée avec 5 couples d'amorces : la liste des amorces PCR utilisées pour l'amplification, ainsi que les gènes ciblés, sont présentée ci-dessous dans le Tableau 2.

[0180] [Tableaux2]

Nom	Séquence 5'-3'	Gène cible	Taille amplicon (pb)
16S-F osteo	GCAGCCGCGGTAATAC (SEQ ID No: 3)	<i>16S rRNA</i>	
16S-R osteo	Bioteg-CACGAGCTGACGACA (SEQ ID No: 4)		510
MT2-F	TCCAGCGCCGCTT (SEQ ID No: 5)	IS6110 [Y14045.1]	204
MT1-R	Bioteg-CAGATGGCTTGCTCGAT (SEQ ID No: 6)		
staph-F	CCGTGAACGTGGTCAA (SEQ ID No: 7)	<i>tuf</i>	370
staph-R	Bioteg-ACCATTTCAGTACCTTCTG GTAA (SEQ ID No: 8)		
β -Globin-F	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC (SEQ ID No: 9)	β -globin [UO1317.1]	407
β -Globin-R	Bioteg-GGAAAATAGACCAATAGG CAG (SEQ ID No: 10)		
MecA-MR 3-F	AAATCGATGGTAAAGGTTGG (SEQ ID No: 11)	<i>mecA</i> [NG047936.1]	533
MecA-MR 4-R	Bioteg-AGTTCTGCAGTACCGGATT T (SEQ ID No: 12)		

[0181] Tableau 2 – Liste des amorces PCR utilisées pour l'amplification des gènes cibles, où « F » désigne l'amorce sens et « R » désigne l'amorce antisens

[0182] Pour chaque couple d'amorces, l'amorce antisens a été marquée en 5' avec de la biotine liée à l'amorce par un bras espaceur TEG (« Bioteg »). La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 50 μ L dans un mélange constitué de tampon 1X PCR comprenant :

- 3,75 U de Taq® ADN polymérase Hot Diamond (Eurogentec, Selland, Belgium)
- 3 mM MgCl₂, 0,2 mM désoxynucléotides (dNTPs) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- entre 0,08 et 0,2 μ M de chaque amorce (Integrated DNA Technologies, Clareville, IA, USA)
 - 50 pg d'ADN extrait de l'échantillon à tester.
- [0183] L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur GTQ-Cycler 96 (Hain Life Sciences, Nehren, Germany), avec le programme suivant : 30s à 94°C, 30s à 58°C et 40s à 72°C sur 35 cycles.
- [0184] La purification des amplicons ainsi obtenus a été réalisée sur un automate Microlab Starlet (Hamilton) contrôlé par le logiciel VENUS 4.50. L'automate est équipé d'un module de chauffage et agitation Hamilton Heater Shaker (HHS), d'un module de chauffage et refroidissement Hamilton Heater Cooler (HHC), d'un bloc chauffant HeatPAC (Inheco) à plage de température de l'ambiante à 135 °C, d'un aimant NucleoMag SEP (Macherey-Nagel®) et d'une hotte HEPA (Noroit). La totalité du volume de réaction par PCR a été purifié à l'aide de billes magnétiques sparQ Beads (Quantabio) selon les recommandations du fournisseur. Les ADN purifiés ont été élués dans 50 μ L d'eau qualité biologie moléculaire.
- [0185] Les amplicons ont été ensuite dénaturés à 95°C pendant une minute puis placés à 4°C. 115 μ L de tampon d'hybridation ont été ajoutés aux 50 μ L d'amplicons dénaturés, préalablement obtenus par l'amplification décrite précédemment. Le tampon d'hybridation comprenait les constituants suivants :
- Solution de Denhardt avec 1 % de Ficoll (400), 1 % de polyvinylpyrrolidone et 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) (Invitrogen),
 - Citrate de solution saline-sodium (SSC) 2,5X (Sigma),
 - ADN de sperme de saumon (100 μ g/mL) (Invitrogen),
 - l'oligonucléotide de contrôle de l'hybridation et complémentaire de CIH_ol avec une biotine à l'extrémité 5', de séquence nucléotidique 5' BIOTEG-GACACGACCGGAAACATATT 3' (SEQ ID No : 2) (Integrated DNA Technology Inc.)).
- [0186] Les molécules cibles marquées ainsi obtenues ont été mises en présence des biopuces pour la réalisation de l'hybridation selon le protocole présenté dans l'exemple 5 : deux expérimentations ont été réalisées, une avec une biopuce comprenant un dendrimère proposé par l'art antérieur « 96 CHO », et la seconde avec une biopuce comprenant un dendrimère conforme à l'invention D1. Ces dendrimères sont tels que décrits, respectivement, dans le Test 1 et l'Exemple 2 ci-avant. La fixation des dendrimères sur les biopuces a été réalisée comme décrit dans l'Exemple 4 ci-avant. Différentes molécules sondes ont été fixées sur les dendrimères comme décrit dans l'Exemple 4. Les sondes fixées sur les dendrimères ont été définies à partir de chaque gène cible, en utilisant le logiciel BioEdit ; ces molécules sondes sont telles que décrites dans le Tableau 3.

[0187] [Tableaux3]

Nom de la sonde	Séquence 5'-3'	Micro-organisme
10	AACTGCATCTGATACTGGCAAGCTT (SEQ ID No: 13)	<i>Escherichia coli</i>
11	ACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATG (SEQ ID No: 14)	<i>Escherichia coli</i>
12	TCGATTAGAGGTTGTGGTCTTGAA (SEQ ID No: 15)	<i>Proteus mirabilis</i>
13	AATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTA (SEQ ID No: 16)	<i>Proteus mirabilis</i>
68P	GCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG (SEQ ID No: 17)	<i>Enterobacteriaceae</i>
71P	AGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT (SEQ ID No: 18)	<i>Enterobacteriaceae</i>
72P	CCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACC (SEQ ID No: 19)	<i>Enterobacteriaceae</i>

[0188] Tableau 3 – Liste des sondes fixées sur le dendrimère « 96 CHO » et le dendrimère D1 conforme à l'invention au sein des biopuces

[0189] La même quantité de chacun des amplicons a été déposée sur la biopuce fonctionnalisée par le dendrimère « 96 CHO » de l'art antérieur et sur la biopuce fonctionnalisée par le dendrimère D1 conforme à l'invention.

[0190] Après la réalisation du protocole de détection, mis en place conformément à ce qui est présenté dans l'exemple 6 ci-avant, les résultats obtenus en termes d'intensité du signal, présentés [Fig.7], ont montré de manière générale des intensités d'hybridation des molécules cibles significativement supérieures pour la biopuce comprenant le dendrimère D1 conforme à l'invention, comparé à celles obtenues avec la biopuce comprenant le dendrimère « 96 CHO ». Les différences d'intensité entre les deux types de dendrimères sont particulièrement marquées lorsque les intensités obtenues pour le dendrimère « 96 CHO » sont faibles : ces résultats attestent des performances supérieures des biopuces comprenant un dendrimère D1 conforme à l'invention. En effet, pour une même sonde, l'obtention d'un signal d'hybridation plus intense signifie une meilleure sensibilité et donc de meilleures performances de détection.

[0191] Ces performances supérieures ont également été confirmées par l'analyse com-

parative de la somme et de la moyenne des intensités de détection mesurées pour l'ensemble des sondes, présentée dans le Tableau 4 ci-dessous :

[0192] [Tableaux4]

Dendrimère	Somme des intensités de détection mesurées	Moyenne des intensités de détection mesurées	Probabilité de présence d' <i>Enterobacteriaceae</i> détectée dans l'échantillon	Probabilité de présence d' <i>Escherichia coli</i> détectée dans l'échantillon
Dendrimère "96 CHO"	227,41	32,49	0,84	0,404
Dendrimère D1	458,79	65,54	0,986	0,712
D1/96CHO (exprimé en %)	50,43%	50,43%		

[0193] Tableau 4 - Comparaison, pour le dendrimère D1 et le dendrimère « 96 CHO », des intensités de détection mesurées (somme et moyenne des intensités, unité arbitraire) pour l'ensemble des sondes, et des performances de prédiction de la présence des microorganismes dans l'échantillon biologique.

[0194] Les valeurs des variables « somme » et « moyenne » des intensités de détection mesurées apparaissent significativement plus élevées pour le dendrimère D1 conforme à l'invention, ce qui indique un pronostic d'identification plus fiable pour ce dernier que pour le dendrimère « 96 CHO ». Le tableau 5 montre également, pour le dendrimère D1, une meilleure probabilité de détection de la présence d'un microorganisme spécifique : si les deux types de dendrimères (Dendrimère D1 et Dendrimère « 96 CHO ») permettent la détection du genre *Enterobacteriaceae*, avec une probabilité de présence que l'on peut toutefois noter plus élevée pour le dendrimère D1, seul le dendrimère D1 permet la détection d'*Escherichia coli* au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*. En effet, pour qu'un microorganisme puisse être détecté, la probabilité de sa présence au sein de l'échantillon biologique doit être supérieure ou égale à 0,5.

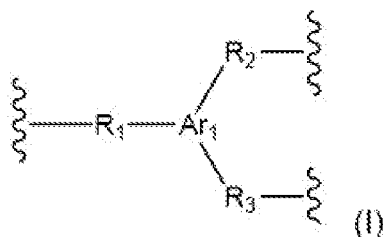
Revendications

[Revendication 1]

Support solide ou semi-solide comprenant une surface sur laquelle sont fixés des dendrimères phosphorés comportant à leur périphérie au moins un groupement fonctionnel pour leur liaison covalente audit support et au moins un groupement fonctionnel libre, caractérisé en ce que lesdits dendrimères sont constitués d'un noyau central phosphoré P0 comprenant au moins deux groupements à partir desquels sont formées plusieurs couches successives, comprenant :

- n couches intermédiaires, identiques ou différentes, n étant un nombre entier compris entre 1 et 4, chacune des couches intermédiaires étant constituée d'unités P1, identiques ou différentes, répondant chacune à la formule générale (I) :

[Chem. 1]



dans laquelle :

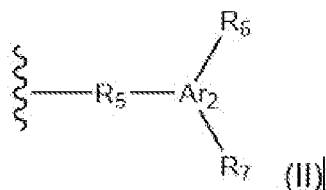
R_1 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₄- où R_4 représente un groupement alkyle linéaire, ramifié et/ou cyclique, saturé ou insaturé, comprenant de 1 à 5 carbones, ou R_1 représente un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire, ramifié et/ou cyclique, comprenant de 1 à 6 atomes de carbones, éventuellement substitué et/ou éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N, Si et S,

Ar_1 représente un cycle aromatique comprenant 6 ou 8 chaînons, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements alkyle linéaires, ramifiés et/ou cycliques comprenant chacun de 1 à 3 carbones,

R_2 et R_3 , identiques ou différents, représentent chacun un radical carboné saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 1 à 3 atomes de carbones,

lesdites couches intermédiaires étant dépourvues d'atome de phosphore, - et une couche externe constituée d'unités P2, identiques ou différentes, répondant chacune à la formule générale (II) :

[Chem. 2]



dans laquelle

R_5 représente un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de silicium, un groupement -NH- ou -NR₈- où R_8 représente un groupement alkyle linéaire, ramifié et/ou cyclique, saturé ou insaturé, comprenant de 1 à 5 carbones, ou R_5 représente un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire, ramifié et/ou cyclique, comprenant de 1 à 6 atomes de carbones, éventuellement substitué et/ou éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N, Si et S,

Ar_2 représente un cycle aromatique comprenant 6 ou 8 chaînons, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements alkyle linéaires, ramifiés et/ou cycliques, comprenant chacun de 1 à 3 carbones,

R_6 et R_7 , identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène, un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène, -CH=O, -CH₂OH, -CH₂Cl, -OH, -SH, -CH₂-SH, -CO-OCH₃, -COOH, -NHR₉, -NR₁₂R₁₃, -O-R₉, -R₉-SO₂-R₁₀, -CN₃, -CNO₂, -P(O)(OR₉)OR₁₀ et -P(O)R₉R₁₀R₁₁, ou un radical carboné, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 1 à 3 atomes de carbones et comprenant au moins un groupement fonctionnel choisi parmi un atome d'halogène -CH=O, -CH₂OH, -CH₂Cl, -OH, -SH, -CH₂-SH, -CO-OCH₃, -COOH, -NHR₉, -NR₁₂R₁₃, -O-R₉, -R₉-SO₂-R₁₀, -CN₃, -CNO₂, -P(O)(OR₉)OR₁₀ et -P(O)R₉R₁₀R₁₁,

où

R_9 , R_{10} et R_{11} , identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 5 atomes de carbones,

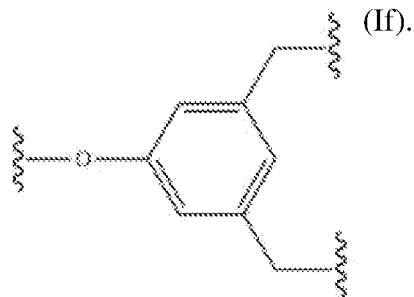
et R_{12} et R_{13} , identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 5 atomes de carbones, ou R_{12} et R_{13} forment ensemble, avec l'atome d'azote auxquels ils sont attachés, un cycle à 5 à 7 chaînons, saturé ou insaturé,

R_6 et R_7 ne représentant pas simultanément un atome d'hydrogène.

[Revendication 2]

Support selon la revendication 1, dans lequel des unités P1 de couches intermédiaires desdits dendrimères répondent à la formule (If) :

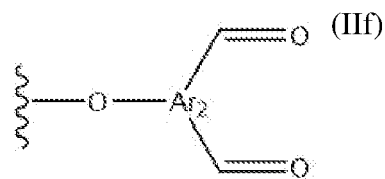
[Chem. 12]



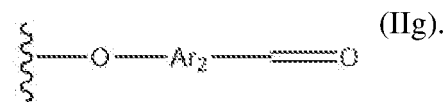
[Revendication 3]

Support selon la revendication 1 ou 2, dans lequel des unités P2 de la couche externe desdits dendrimères répondent à la formule (IIg) ou (IIg) :

[Chem. 18]



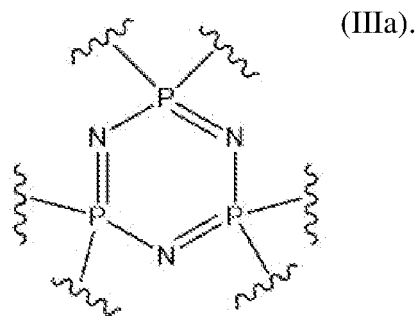
[Chem. 19]



[Revendication 4]

Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le noyau central desdits dendrimères répond à la formule (IIIa) :

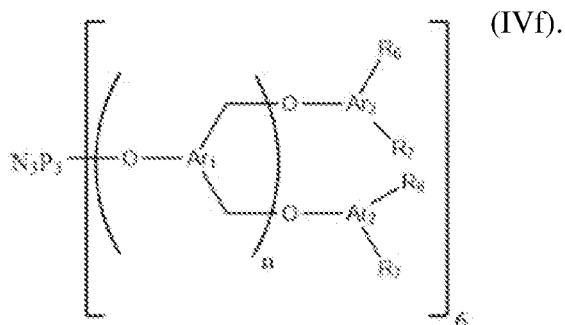
[Chem. 3]



[Revendication 5]

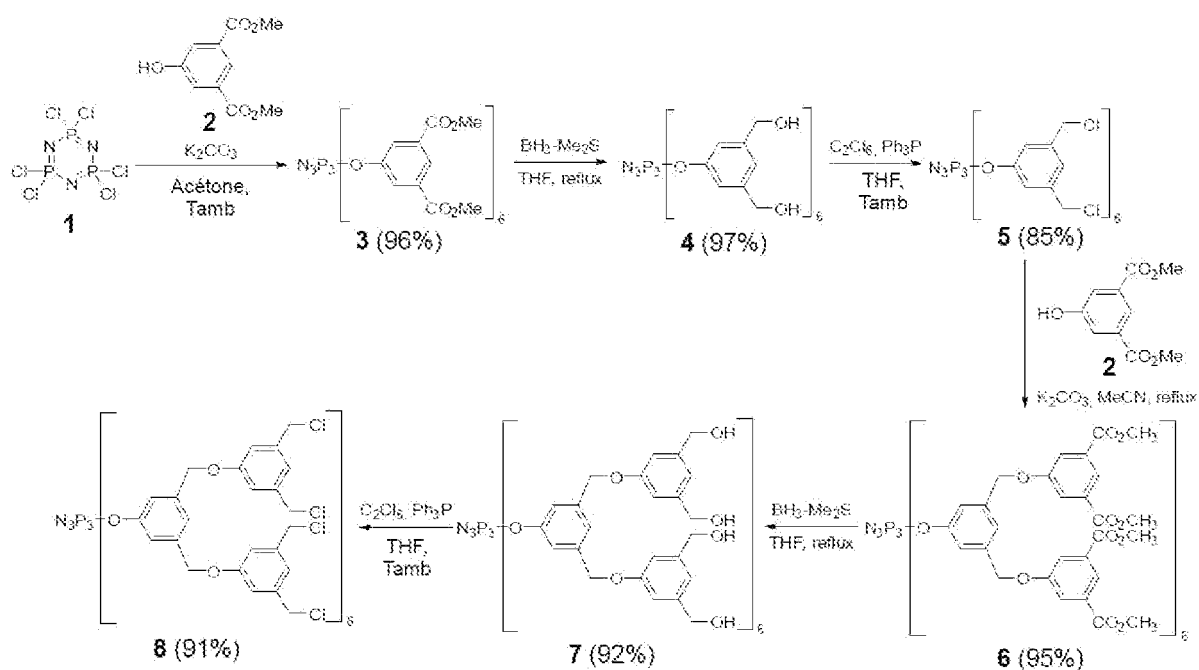
Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel lesdits dendrimères répondent à la formule (IVf) :

[Chem. 29]

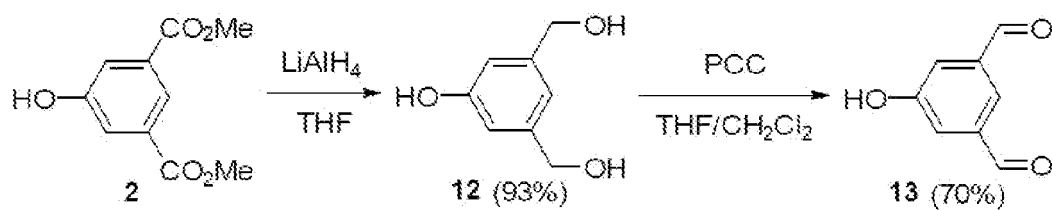


- [Revendication 6] Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, formé en verre, en silicium, en plastique ou en métal.
- [Revendication 7] Procédé de préparation d'un support solide ou semi-solide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de fixation desdits dendrimères sur ladite surface dudit support.
- [Revendication 8] Procédé selon la revendication 7, selon lequel ladite étape de fixation est réalisée par réaction de groupements fonctionnels desdits dendrimères avec des fonctions portées par ladite surface du support aptes à réagir avec lesdits groupements fonctionnels pour former une liaison covalente.
- [Revendication 9] Procédé selon la revendication 8, selon lequel des groupements fonctionnels libres desdits dendrimères sont des groupements aldéhyde, et ladite surface du support comporte des fonctions amine.
- [Revendication 10] Utilisation d'un support solide ou semi-solide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la fabrication d'une biopuce.
- [Revendication 11] Utilisation selon la revendication 10, comprenant la liaison covalente d'au moins une molécule, dite molécule sonde, sur des groupements fonctionnels libres desdits dendrimères.
- [Revendication 12] Biopuce caractérisée en ce qu'elle comporte un support solide ou semi-solide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et au moins une molécule, dite molécule sonde, fixée de manière covalente à des groupements fonctionnels libres desdits dendrimères.
- [Revendication 13] Biopuce selon la revendication 12, dans laquelle ladite molécule sonde est une molécule d'acide nucléique, un lipide, un polysaccharide, un glucide, un glycoside, un peptide ou une protéine.
- [Revendication 14] Utilisation d'une biopuce selon la revendication 12 ou 13 pour la détection, dans un échantillon, d'une molécule cible avec laquelle ladite molécule sonde est apte à interagir de manière spécifique.

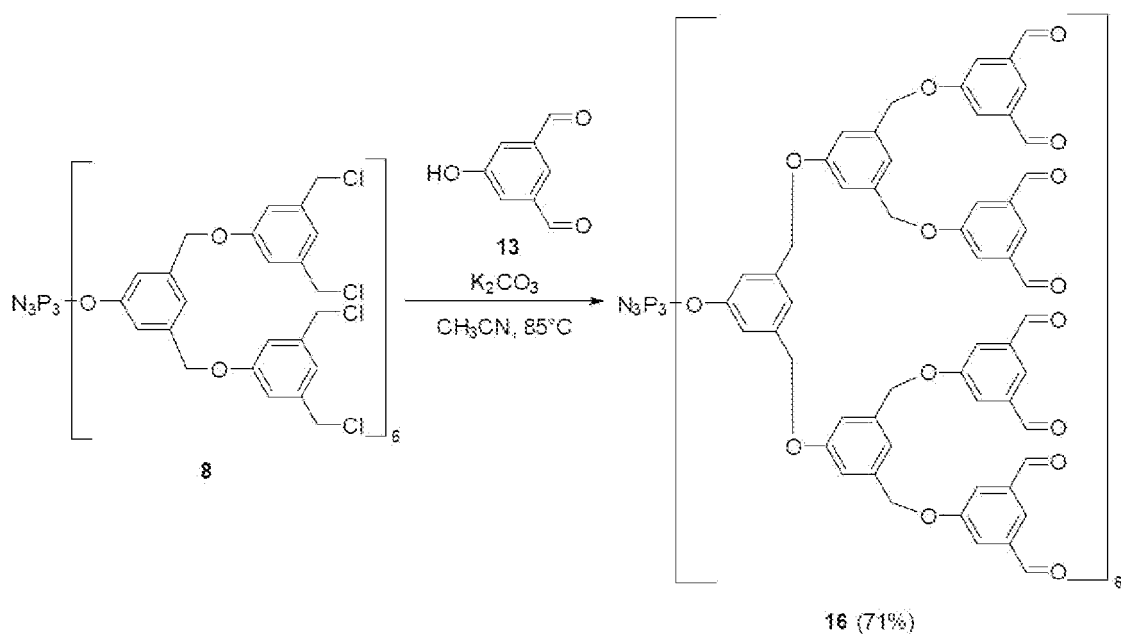
[Fig. 1]



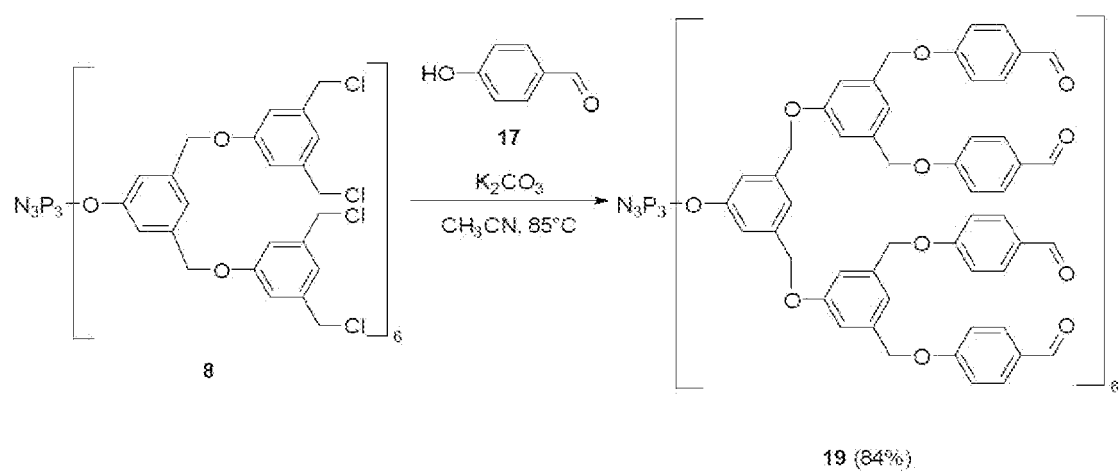
[Fig. 2]



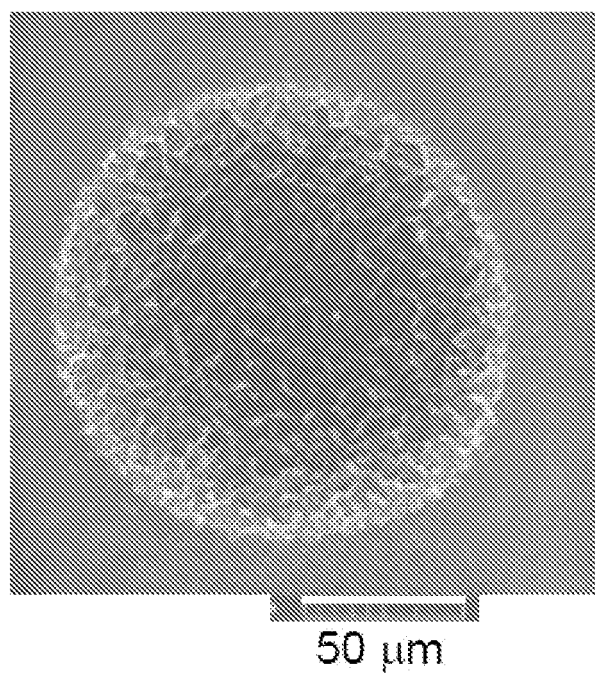
[Fig. 3]



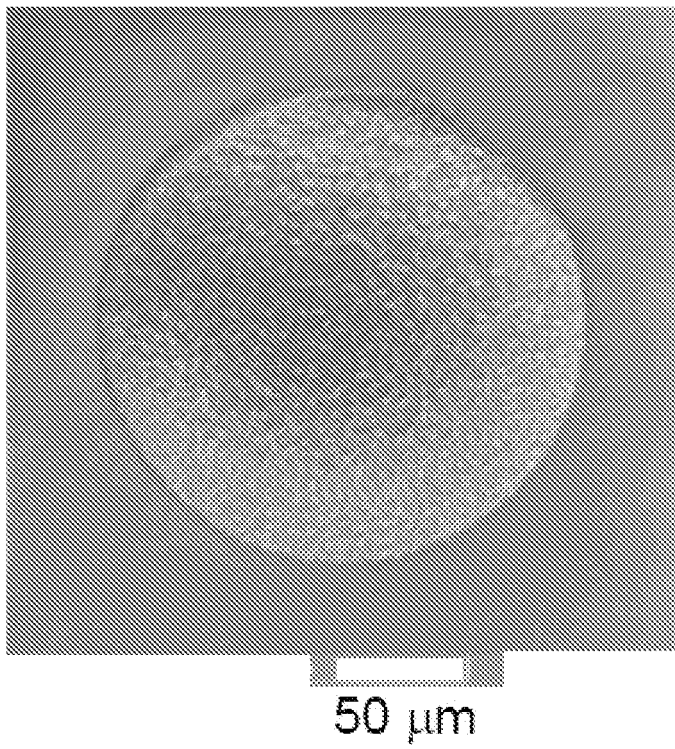
[Fig. 4]



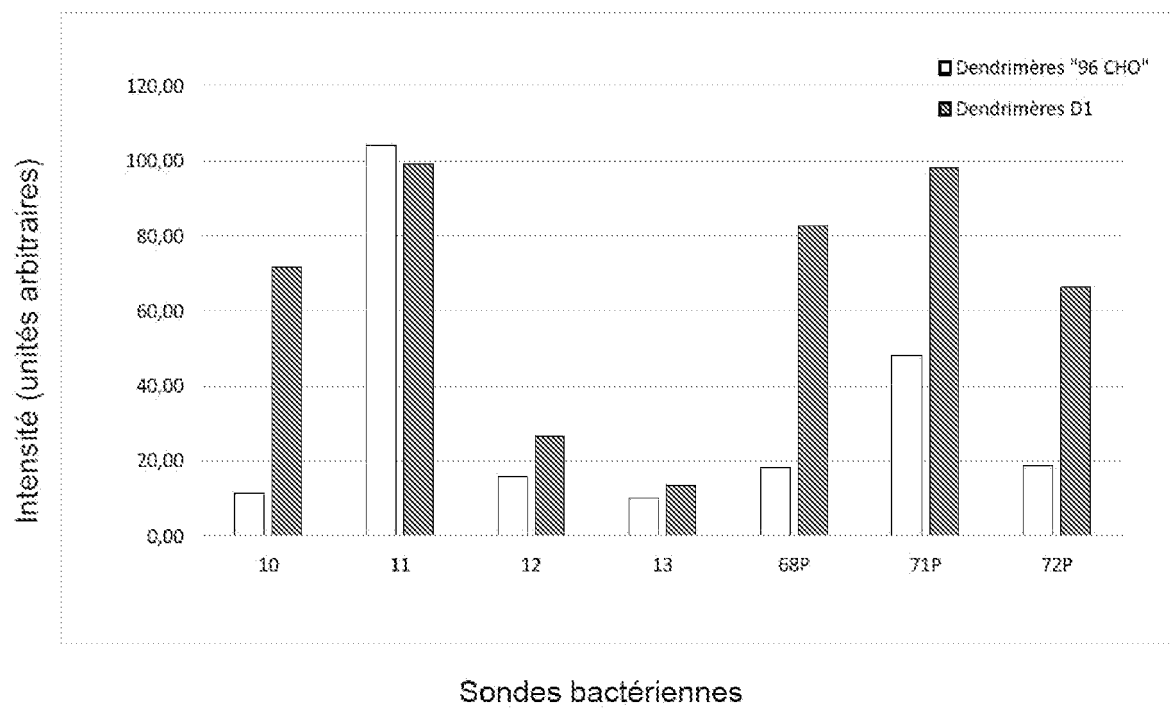
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 916386
FR 2212390

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, D	FR 2 838 737 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 24 octobre 2003 (2003-10-24) * revendications ; figure 2 * -----	1-14	C07F 9/6581 C07H 21/00 C08G 83/00 G01N 33/543
A	JEAN-PIERRE MAJORAL ET AL: "Phosphorhydrazones as Useful Building Blocks for Special Architectures: Macrocycles and Dendrimers", EUROPEAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY, WILEY-VCH VERLAG , WENHEIM, DE, vol. 2019, 11 décembre 2018 (2018-12-11), pages 1457-1475, XP072132987, ISSN: 1434-1948, DOI: 10.1002/EJIC.201801184 * le document en entier * -----	1-14	
A	DAGDAG O ET AL: "Dendrimeric Epoxy Resins Based on Hexachlorocyclotriphosphazene as a Reactive Flame Retardant Polymeric Materials: A Review", JOURNAL OF INORGANIC AND ORGANOMETALLIC POLYMERS AND MATERIALS, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 31, no. 8, 3 février 2021 (2021-02-03), pages 3240-3261, XP037514216, ISSN: 1574-1443, DOI: 10.1007/S10904-021-01900-X [extrait le 2021-02-03] * page 3243 * -----	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N C09J C08G C12Q B01J C40B
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 octobre 2023		Hennard, Christophe	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

FA 916386

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **16-10-2023**

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

FR 2838737	A1	24-10-2003	AT	557029	T	15-05-2012
			AU	2003246839	A1	10-11-2003
			EP	1501842	A2	02-02-2005
			ES	2387481	T3	24-09-2012
			FR	2838737	A1	24-10-2003
			US	2005214767	A1	29-09-2005
			US	2009203546	A1	13-08-2009
			WO	03091304	A2	06-11-2003