

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
23 octobre 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2008/125637 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 11/14 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)  
C12N 11/08 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2008/054442

(22) Date de dépôt international : 11 avril 2008 (11.04.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
07/54424 12 avril 2007 (12.04.2007) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
UNIVERSITE VICTOR SEGALEN - BORDEAUX  
2 [FR/FR]; 146, rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux  
(FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016  
Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DELERIS,  
Gérard [FR/FR]; 14, rue du Livran, F-33000 Bordeaux  
(FR). RUBIO ALBENQUE, Sandra [FR/FR]; 19, rue  
de Chambrère, F-33127 Saint Jean d'Illac (FR). BEN-  
NETAU, Bernard [FR/FR]; 42, chemin de Gardeloup,  
F-33360 Camblanes et Meynac (FR). DESBAT, Bernard  
[FR/FR]; 4, allée Georges Brassens, F-33600 Pessac (FR).  
BUFFIERE, Frédéric [FR/FR]; 32, rue des lavandières,  
F-33600 Pessac (FR). CHAGNAUD, Jean-Luc [FR/FR];  
11 bis, place Saint Jean d'Etampes, F-33650 La Brede  
(FR).

(74) Mandataire : POULIN, Gérard; Brevetome, 3, rue du  
Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A SUBSTRATE FOR IMMOBILISING A CELL, SAID SUBSTRATE AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCÉDE DE PREPARATION D'UN SUPPORT POUR L'IMMOBILISATION D'UNE CELLULE, LEDIT SUPPORT ET SES UTILISATIONS

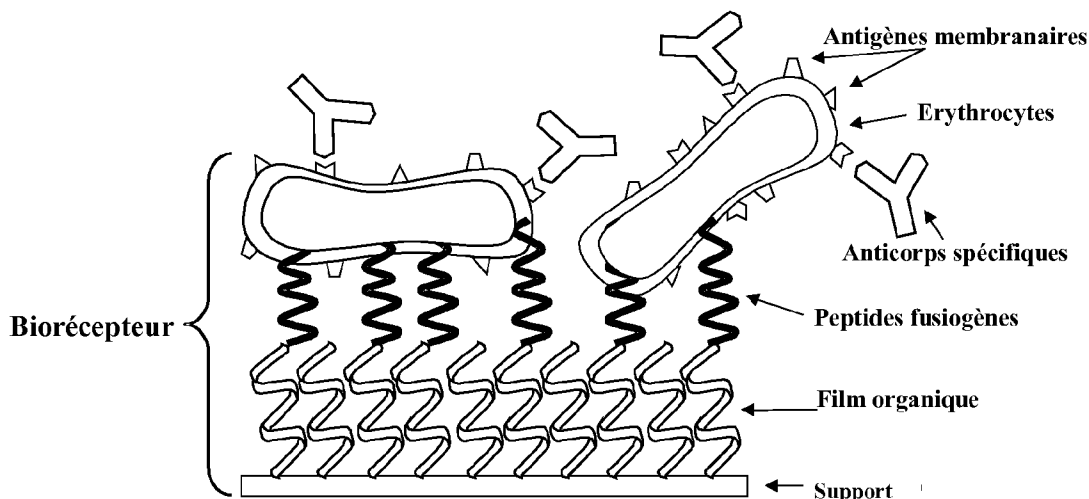


FIG.8

(57) Abstract: The invention relates to a method for preparing a solid substrate capable of immobilising at least one cell and/or at least one cell portion, said method comprising the step of binding to said solid substrate at least one fusogenic compound capable of insertion into the cell membranes. The invention also relates to a method for immobilising at least one cell and/or at least one cell portion using the solid substrate thus obtained, to said solid substrate, and to the uses thereof in the field of biomedical diagnosis or sanitary monitoring of biological fluids for human or animal use.

[Suite sur la page suivante]

WO 2008/125637 A1



IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

---

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne un procédé de préparation d'un support solide susceptible d'immobiliser au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule, ledit procédé comprenant une étape consistant à fixer audit support solide un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires. La présente invention concerne également un procédé pour immobiliser au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule utilisant le support solide ainsi préparé, ledit support solide et ses utilisations dans le domaine du diagnostic biomédical ou de la surveillance sanitaire de fluides biologiques ou destinés à l'usage humain ou animal.

**PROCEDE DE PREPARATION D'UN SUPPORT POUR  
L'IMMOBILISATION D'UNE CELLULE,  
LEDIT SUPPORT ET SES UTILISATIONS**

5

**DESCRIPTION**

**DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention relève de la biochimie, de la médecine, de la biologie, et en particulier de la biochimie analytique et du dosage immunologique. Plus particulièrement, la présente invention concerne la conception d'un instrument d'analyse et de diagnostic (puce d'analyse ou biocapteur) permettant d'examiner des échantillons de différente nature et notamment des échantillons biologiques. Cette puce d'analyse comprend un support, éventuellement fonctionnalisé par une matrice organique, un agent de pénétration tel qu'un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires et éventuellement une cellule ou partie de cellule. La présente invention concerne le procédé de fabrication et l'utilisation d'un tel support pour un diagnostic biomédical et/ou pour une surveillance sanitaire.

**ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE**

Lors d'échanges sanguins transfusionnels, un conflit peut survenir entre le produit du donneur et l'organisme receveur. La sécurité transfusionnelle doit assurer la compatibilité immunologique immédiate mais aussi prévenir l'incompatibilité de futures transfusions ; ceci est primordial d'un point de vue

santé publique. Des transfusions mal contrôlées peuvent provoquer l'apparition d'anticorps dirigés contre les structures de surface des hématies (antigène) et ainsi entraîner une hémolyse qui peut conduire, lors d'une

5 réaction immunitaire grave, au décès du patient. De même, il est fondamental de prévenir ou de surveiller toute immunisation non désirée. Ceci s'applique tout particulièrement aux immunisations fœto-maternelles. En effet, à la suite d'un premier accouchement une femme

10 ne possédant pas l'antigène Rhésus D (phénotype RH D-) sur ses érythrocytes peut développer des anticorps dirigés contre cet antigène présent à la surface des hématies de son premier enfant (phénotype RH D+). Cette réaction immunologique se produit lors du contact entre

15 le sang de la mère et celui de l'enfant lors de l'accouchement. Dans le cas d'une seconde grossesse (si le second enfant possède lui aussi l'antigène Rhésus D (RH D+)) un conflit immunologique grave pour la mère et le fœtus peut se produire entraînant parfois la mort du

20 fœtus ou des problèmes chez le nouveau-né (cyanose : troubles d'oxygénation). Ainsi le test consistant à rechercher des anticorps irréguliers acquis secondairement (transfusion, grossesse, greffe) par un individu a une importance considérable. Ainsi, pour

25 assurer le bon déroulement d'une transfusion sanguine, une recherche d'anticorps irréguliers (R.A.I.) systématique est réalisée en complément d'un phénotypage précis.

Ces examens sont pratiqués dans tous les

30 laboratoires d'analyses médicales et dans les centres de transfusion sanguine. Aussi, les examens immuno-

hématologiques doivent être rapides et les plus fiables possibles.

Depuis son introduction en 1945, le test de Coombs reposant sur l'hémagglutination (agrégation des globules rouges due à la multifonctionnalité des anticorps) demeure la technique de référence dans la recherche des anticorps irréguliers. Même si la technique en tube a été la première décrite, elle est progressivement remplacée par des techniques moins subjectives, plus sensibles et plus standardisées. Les techniques en gel ont été introduites en 1990 et sont commercialisées aujourd'hui par les sociétés Diamed et Ortho. Des techniques en phase solide, comme capture-R (Immucor), Ready Screen (Biotest) ou Biloba (Scibiex) sont également présentes sur le marché. Actuellement, la technologie en gel domine le marché de l'immunohématologie. Elle présente cependant un désavantage majeur en raison des difficultés d'automatisation.

En effet, la forte augmentation des transfusions sanguines dans les milieux hospitaliers et l'accroissement considérable du nombre d'analyses de sang dans les laboratoires privés incitent les fabricants à automatiser leurs méthodes d'analyses sanguines.

Afin d'améliorer ces systèmes, il serait particulièrement intéressant d'élaborer un nouvel outil immunologique qui présenterait les qualités des tests actuels en apportant un maximum d'améliorations :

- visualisation facile, directe et rapide de la liaison antigène-anticorps
- une grande fiabilité,

- la meilleure sensibilité possible,
  - une possibilité de miniaturisation et d'automatisation permettant de compiler de multiples tests en une seule analyse,
- 5           • enfin un coût faible en mesure de concurrencer ses analogues le plus souvent jetables.

L'utilisation de méthodes spectrales pourrait répondre à ces différents points en particulier au niveau de la rapidité, la simplicité et  
10 la sensibilité. De plus, la visualisation directe de l'interaction autoriserait une évaluation des constantes d'affinité des anticorps vis-à-vis des antigènes et permettrait ainsi une détermination et une quantification plus précise des immunoglobulines.

15           De nos jours, la plupart de ces impératifs peuvent être surmontés par l'utilisation de technologies visant à immobiliser des biomolécules. Ces dernières permettent alors la détection d'autres analytes cibles. Ces systèmes analytiques, connus sous  
20 le nom de biocapteurs, sont très étudiés dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement et tout particulièrement celui du biomédical avec les puces à ADN ou sur les puces à protéines, par exemple.

Le problème majeur dans le cas de  
25 l'immobilisation de cellules sur un biorécepteur est la conservation de leurs propriétés biologiques. L'utilisation du couplage covalent d'une des biomolécules de surface de la cellule est rarement employée car les techniques de greffage affectent la  
30 viabilité cellulaire. Le plus souvent les cellules sont seulement adsorbées en surface du support. Parfois, la

croissance cellulaire est réalisée directement sur l'électrode de mesure. Enfin, une technique plus complexe consiste à utiliser un anticorps dirigé contre un élément cellulaire reconnu et à lier cet anticorps au support. Cette technique est d'utilisation spécifique du fait de l'anticorps choisi qui détermine le (ou les) type(s) de cellules immobilisées.

### **EXPOSÉ DE L'INVENTION**

La présente invention permet de résoudre les problèmes techniques cités ci-dessus dans l'exemple des anticorps irréguliers mais déclinables à de nombreux autres cas en proposant un outil qui se définit plus précisément comme un système analytique (biorécepteur) composé d'un élément biologique associé à un support solide et d'une chaîne de mesure (transducteur). Les propriétés de reconnaissance moléculaire de l'élément biologique confèrent une grande sélectivité et une grande affinité à l'interaction biomolécules / analyte cible. Cette dernière engendre un signal qui peut être traduit par différentes méthodes physico-chimiques en une mesure corrélable quantitativement et/ou qualitativement à l'analyte cible, lequel peut être un système biomoléculaire ou cellulaire.

Ainsi, la présente invention propose l'utilisation d'un système d'inclusion supramoléculaire pouvant pénétrer les membranes et ce, pour immobiliser des éléments cellulaires. Ceci représente une technique intermédiaire entre la simple adsorption et le couplage covalent non réalisable jusqu'à présent.

La présente invention permet une visualisation facile, directe et rapide de l'interaction liante ou non liante entre deux biomolécules avec une grande fiabilité, et la meilleure  
5 sensibilité possible. La possibilité de miniaturisation et d'automatisation permet de compiler de multiples tests en une seule analyse.

De plus, la présente invention est remarquable de par le fait qu'elle est non seulement  
10 utile pour rechercher des anticorps irréguliers lors des transfusions sanguines mais qu'elle trouve des utilisations dans tout domaine biologique, médical, agroalimentaire et autre, susceptible de mettre en œuvre une puce à cellules.

15 La présente invention concerne tout d'abord un procédé pour préparer un support solide susceptible d'immobiliser au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule, ledit procédé comprenant une étape  
20 consistant à fixer audit support solide un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires.

Par « composé fusogène », on entend dans le  
25 cadre de la présente invention tout composé qui peut s'ancrer dans une membrane phospholipidique telle qu'une membrane cellulaire et conduire à l'immobilisation de ladite membrane et donc à celle d'une cellule.

30 Dans le cadre de la présente invention, le composé fusogène peut être choisi parmi les composés

fusogènes non peptidiques et les composés fusogènes peptiques.

Par « composé fusogène non peptidique », on entend toute molécule ne contenant ni acide aminé, ni analogue d'acide aminé et capable de s'ancrer dans une membrane phospholipidique telle qu'une membrane cellulaire et conduire à l'immobilisation de ladite membrane. Parmi ces composés fusogènes non peptidiques, sont notamment connus le motif glycosyl phosphatidylinositol (GPI) ou les motifs polyisoprène tels que le motif farnésyl (motif isoprène à 15 atomes de carbone) ou le motif géranylgéranyl (motif isoprène à 20 atomes de carbone). En effet, de nombreuses protéines de diverses fonctions, allant de la catalyse enzymatique à l'adhésion, sont attachées à la face externe de la membrane plasmique des cellules eucaryotes par un ancrage à un GPI. La phosphatase alcaline possède, au niveau de son extrémité C-terminale, un tel ancrage de structure bien définie (Ronzon, 2001, Thèse Université Claude Bernard-Lyon). L'isoprénylation est une modification post-traductionnelle qui ajoute un groupement farnésyl ou géranylgéranyl à une protéine présentant un motif particulier en position C-terminale (Maurer-Stroh et Eisenhaber, 2005, Genome Biology, vol. 6, R55).

Par « composé peptidique », on entend dans le cadre de la présente invention toute molécule constituée d'acides aminés ou d'analogues d'acides aminés telle que des peptides, des glycopeptides, des lipopeptides, des pseudopeptides ou des peptidomimétiques. Ces composés peptidiques fusogènes

peuvent être linéaires ou ramifiés, comportant entre 5 et 50 acides aminés, notamment entre 7 et 40 acides aminés et, en particulier, entre 10 et 30 acides aminés.

5 Dans les séquences peptidiques de la présente invention, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre mais ils peuvent aussi être représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-après :

10	A	Ala	alanine
	C	Cys	cystéine
	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phenylalanine
15	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
20	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
25	S	Ser	sérine
	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

30 Dans une première forme de mise en œuvre de la présente invention, le composé peptidique fusogène

utilisé est un peptide basique issu de protéines virales, de facteurs de transcription ou de toxines. Plusieurs peptides basiques dérivés de protéines virales, de facteurs de transcription et de toxines, possèdent la capacité de traverser les membranes sans les altérer (Thoren et al., 2000, FEBS Lett., vol. 482, pages 465-8). Ceci a conduit à l'élaboration du premier vecteur basique de 16 aminoacides appelé Pénétratine (Demande internationale WO 97/12912). Ce peptide dérive de l'homéodomaine d'un facteur de transcription de *Antennapedia drosophila*. Ses propriétés particulières permettent son utilisation en tant que vecteur de transport de substances actives hydrophiles à l'intérieur des cellules. Plusieurs autres vecteurs d'internalisation sont également connus tels que ceux décrits dans la demande internationale WO 99/07728.

Dans une seconde forme de mise en œuvre de la présente invention, le composé peptidique fusogène utilisé est un peptide dont la composition en acides aminés est riche en acides aminés hydrophobes i.e. riche en alanine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine. Avantageusement, le composé peptidique fusogène comprend au moins 40%, notamment au moins 50% et, en particulier, au moins 60% d'acides aminés hydrophobes par rapport au nombre total d'acides aminés de sa séquence. De tels peptides fusogènes sont avantageusement des peptides dérivés de peptides signaux et, plus particulièrement, du domaine hydrophobe de ces derniers ou des peptides fragments de protéines membranaires notamment de virus tels que le

VIH (virus de l'immunodéficience humaine), le HTLV (virus du lymphome humain à cellules T), le MLV (virus de la leucémie murine) et le virus de Herpes.

Le composé peptidique fusogène selon la présente invention est avantageusement choisi dans le groupe constitué par les peptides présentant les séquences suivantes :

- AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS (SEQ ID NO. 1 dans la liste de séquences en annexe) correspondant à la séquence comprise entre les acides aminés 519 et 541 à l'extrémité N-terminale de la protéine Gp41 du VIH,

- RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO. 2 dans la liste de séquences en annexe) correspondant à la séquence de la 3<sup>ème</sup> hélice de l'homéodomaine du facteur de transcription Antennapedia, peptide également connu sous le nom de Pénétratine,

- TAALRLGIKLTQHYFGLLTAFGSNFGTIG (SEQ ID NO. 3 dans la liste de séquences en annexe) correspondant à la séquence du domaine fusogène interne de la protéine F1 du virus du Sendai, peptide SV201 dans l'article de Ghosh et al., 2000, Biochem., vol. 39, pages 11581-92 ;

- MMIMLGAICAIIVVVIVIVFFT (SEQ ID NO. 4 dans la liste de séquences en annexe) correspondant à la séquence transmembranaire de la protéine Vamp du système SNARE intervenant dans l'exocytose,

- RGGRLSYSRRRFSVSVGR (SEQ ID NO. 5 dans la liste de séquences en annexe) correspondant à un peptide dérivé des protégrines et, plus particulièrement, au peptide SM1738 de la demande internationale WO 99/07728,

- C(Acm)GRKKRRQRRRQC avec C(Acm) = Cys-acétamidométhyle (SEQ ID NO. 6 dans la liste de séquences en annexe) correspondant au peptide d'internalisation basique TA-T du VIH,

5 leurs dérivés et leurs fragments.

La présente invention envisage d'utiliser des dérivés des peptides fusogènes définis ci-dessus. Par « dérivé des peptides fusogènes », on entend des peptides qui présentent 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,  
10 90% et/ou 95% d'identité avec les séquences des peptides fusogènes préférés données ci-dessus. Les dérivés des peptides fusogènes peuvent également présenter, par rapport aux séquences des peptides fusogènes données ci-dessus, au moins un acide aminé  
15 supplémentaire en partie C-terminale et/ou en partie N-terminale, une modification post-traductionnelle et/ou une modification chimique en particulier une glycosylation, une amidation, une acylation, une acétylation, une méthylation, ainsi que les peptides  
20 qui portent un groupement protecteur qui permet d'éviter leur dégradation.

Les dérivés des peptides fusogènes peuvent également être ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont choisis dans le groupe constitué par des  
25 énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés naturels de conformation D, des bêta acides aminés, des acides aminés alpha substitués, des acides aminés rares notamment l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allohydroxylysine, la 6-N-méthyllysine, la N-éthylglycine,  
30 la N-méthylglycine, la N-éthylasparagine, l'alloisoleucine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline,

la pyroglutamine, l'acide aminobutyrique et des acides aminés synthétiques notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés. Les dérivés des peptides fusogènes  
5 couvrent selon l'invention également les rétropeptides et les rétroinverso-peptides, de même que les peptides dont la chaîne latérale d'un ou plusieurs acides aminés est substituée par des groupements qui ne modifient pas l'activité fusogène desdits peptides fusogènes.

10 Les fragments des peptides fusogènes préférés présentent avantageusement plus de 5 acides aminés, notamment plus de 10 acides aminés ou encore plus de 15 acides aminés.

Il est clair que les dérivés et les  
15 fragments des peptides fusogènes susceptibles d'être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention doivent également présenter une activité fusogène. Il sera facile pour l'homme du métier de vérifier la présence de cette activité notamment en utilisant la  
20 technique décrite dans la partie expérimentale ci-après.

Les peptides fusogènes, leurs dérivés et leurs fragments peuvent être des produits naturels, des produits recombinants obtenus selon des techniques de  
25 biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier ou être synthétisés chimiquement selon des techniques telles que la synthèse en phase solide ou liquide également bien connues de l'homme du métier.

Dans le cadre de la présente invention, le support solide sur lequel le composé fusogène est fixé est notamment un support solide inorganique. Avantageusement, le support solide selon la présente invention est choisi dans le groupe constitué par les verres, le quartz, les silices, les céramiques (par exemple, de type oxyde), les métaux (par exemple, aluminium, chrome, cuivre, zinc, argent, nickel, étain ou or) et les semi-conducteurs (par exemple, silicium, germanium, ITO). Dans une autre variante de l'invention, le support solide ou la surface dudit support solide est en un matériau organique comme un polymère ou une résine incluant le nylon, le polyéthylène glycol, les polycarbonates, les polyfluoropolymères ou les composites.

Ledit support solide peut se présenter sous diverses formes de taille variable. A titre d'exemples et de façon non exhaustive, il peut se présenter sous forme de lames, de microplaquettes, de particules, de billes ou de microcanaux de type capillaires. Ces différents types de support peuvent avoir des tailles variant de quelques centaines de micromètres à plusieurs centimètres.

Dans une première forme de mise en œuvre de la présente invention, le support solide présente une surface portant des groupements fonctionnels (ci-après désignée par « surface fonctionnalisée »). De façon avantageuse, ces groupements fonctionnels sont choisis parmi les groupements hydroxyles, des entités radicalaires, les fonctions alcools, amines ou thiols. Cette fonctionnalisation peut être intrinsèque à la

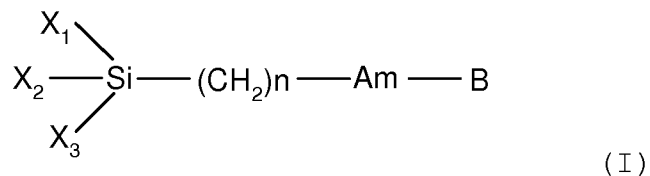
nature du matériau en surface du support solide mis en œuvre. De façon alternative, cette fonctionnalisation peut être obtenue par nettoyage de ladite surface par l'intermédiaire d'au moins un solvant, détergent, 5 rayonnement ou plasma d'oxygène ou tout autre procédé permettant la formation de groupements fonctionnels tels que précédemment définis.

Dans une première variante de la présente invention, le composé fusogène peut être lié de façon 10 directe au support solide fonctionnalisé ou non.

Dans une seconde variante de la présente invention, la liaison entre le composé fusogène et le support solide fonctionnalisé ou non est indirecte et réalisée au travers d'agent de jonction. Dans cette 15 forme de mise en œuvre, un support solide fonctionnalisé est avantageusement choisi. Dans cette seconde variante, au moins un agent de jonction est greffé préalablement à la surface dudit support solide. Ce (ou ces) agent(s) de jonction assure(nt) ensuite la 20 fixation des composés fusogènes sur le support solide et notamment sur les supports solides dont la surface est inorganique. L'homme du métier connaît différents agents de jonction utilisables. A titre d'exemple et de façon non exhaustive, cette forme de mise œuvre 25 correspond au cas d'un support recouvert d'une couche mince d'un polymère siloxane de type polyéthylène polyéthylèneglycol ou de la polylysine (D ou L) permettant de fixer le composé fusogène. Par « polymère », on entend une répétition d'un certain 30 nombre de motifs monomériques avantageusement compris entre 2 et 30.

Dans une variante toute particulière de la présente invention, la fixation indirecte du composé fusogène sur le support solide est réalisée au moyen d'une monocouche autoassemblée organisée d'un ou de plusieurs composés organiques ou organométalliques (Si, Sn, Ge) possédant une chaîne alkyle terminée par un groupe fonctionnel. Ces groupes fonctionnels sont, à titre d'exemple, un hydroxyle, un amino, un carboxyle, un halogène ou un thiol ainsi que leur formes modifiées, notamment des formes activées ou protégées.

Ulman a décrit dans Chem. Rev., 1996, vol. 96, pages 1533-54, la formation de monocouches autoassemblées de type alkyltrichlorosilanes fonctionnalisés. Leur utilisation pour la fixation d'acides nucléiques a été décrite dans la demande de brevet FR 2 804 129. Ainsi, dans le cadre de la présente invention, la monocouche autoassemblée organisée comprend un ou plusieurs composés organosiliciés répondant à la formule I suivante :



20

dans laquelle

- n est compris entre 3 et 40,
- m est égal à 1,
- $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  qui peuvent être identiques ou différents entre eux sont sélectionnés dans le groupe constitué par des groupes alkyles saturés en  $C_1$  à  $C_6$ , linéaires ou ramifiés, et des groupements hydrolysables, au moins l'un de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  représentant un groupement hydrolysable,

25

- A représente le groupement  $-O-(CH_2CH_2O)_k-$   
 $(CH_2)_i-$  dans lequel k est compris entre 1 et 100, et i  
un nombre entier supérieur ou égal à 0

- m étant égal à 1 et  $k \geq 1$

5 • si  $i = 0$ , alors B représente un  
groupement  $-R_1$ ,  $-COR_1$ ,  $-COOR_1$ ,  $-CONR_1R_2$ ,

• si  $i \geq 1$ , alors B représente un  
groupement  $-OR_1$ ,  $-OCOR_1$ ,  $-NR_1R_2$ ,  $-COOR_1$ ,  $-CONR_1R_2$ ,  $-SR_1$  ou  
un atome d'halogène.

10  $R_1$  et  $R_2$  peuvent être identiques ou  
différents représentant un atome d'hydrogène, une  
chaîne hydrocarbonée éventuellement substituée, saturée  
ou insaturée et linéaire ou ramifiée comprenant 1 à 24  
atomes de carbone ou un groupement aromatique.

15 Lorsque B représente un groupement  $-OR_1$ ,  
 $-OCOR_1$  ou  $-COOR_1$ , indifféremment des valeurs de i et  
lorsque  $k \geq 1$  alors il est bien entendu que B peut  
représenter tout groupement résultant de la protection  
d'une fonction hydroxyle ou acide carboxylique tels que  
20 les groupements protecteurs décrits dans *Protective  
groups in organic system* (T. W. GREENE et al., 2 ed,  
Wiley Interscience), par exemple un groupe protecteur  
cyclique.

De façon avantageuse, i est compris entre 0  
25 et 100, notamment entre 0 et 50, en particulier entre 0  
et 10 et, plus particulièrement, i est 0 ou 1.

Au sens de la présente invention, on entend  
par « hydrolysable » tout groupe capable de réagir avec  
un acide en milieu aqueux de façon à donner les  
30 composés  $X_1H$ ,  $X_2H$  ou  $X_3H$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  étant tels que  
définis dans la formule I. Selon un mode de mise en

œuvre avantageux, ledit groupement hydrolysable est sélectionné dans le groupe constitué par les atomes d'halogène, le groupement  $-N(CH_3)_2$  et les groupements  $-OR'$ ,  $R'$  étant un groupe alkyle saturé en  $C_1$  à  $C_6$  linéaire ou ramifié.

On entend par « halogène » aussi bien le fluor que le chlore, le brome ou l'iode.

De façon surprenante, il convient que le (ou les) composé(s) organosilicié(s) de formule I présente un éthylèneglycol pour être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention.

Une monocouche autoassemblée organisée formée sur un support solide permet l'obtention d'une surface organique dense, homogène et de paramètres bien définis à la fois chimiquement et structurellement. La formation de cette monocouche, obtenue grâce aux propriétés d'autoassemblage des composés de formule I pour des valeurs de  $n$ ,  $m$ ,  $k$ , et  $i$  bien définies est parfaitement reproductible pour un ou chaque composé organosilicié ou pour des mélanges de plusieurs composés aussi bien en terme de quantité qu'en terme de répartition en surface du support. Cette fonctionnalisation est stable dans le temps et les molécules greffées présentent une bonne orientation vis-à-vis des molécules biologiques. Ces paramètres de distribution des organosiliciés sur le support solide sont déterminés et suivis par différentes méthodes optiques telles que l'imagerie vibrationnelle, la microscopie à force atomique, l'ellipsométrie...

En outre, la formation d'une monocouche autoassemblée organisée, très dense protège les

liaisons siloxaniques vis-à-vis des traitements chimiques (acides ou basiques notamment), ce qui permet de réaliser des réactions chimiques variées sur la surface du support.

5 Les composés organosiliciés de formule I utilisés dans la présente invention présentent avantageusement des fonctionnalités très variées et une grande réactivité, eu égard à la nature du groupe A et la diversité des groupements B terminaux utilisables,  
10 ces groupements B pouvant bien entendu être modifiés et fonctionnalisés à volonté selon les réactions de chimie organique bien connues de l'homme du métier.

Que la liaison du composé fusogène audit support solide soit directe ou indirecte, les liaisons  
15 impliquées entre le composé peptidique, le support solide et/ou l'agent de jonction sont choisies parmi les liaisons covalentes, ioniques, électrostatiques ou toute interaction chimique forte sans dégradation des liaisons siloxaniques développées entre les composés  
20 organosiliciés et le support solide.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, le procédé pour préparer un support solide susceptible d'immobiliser au moins une cellule ou au  
25 moins une partie de cellule comprend avantageusement les étapes suivantes :

a) la préparation d'un support solide tel que précédemment défini, modifié par une monocouche autoassemblée comprenant au moins un composé  
30 organosilicié répondant à la formule I telle que précédemment définie, ledit composé organosilicié

présentant à son extrémité un halogène, une fonction hydroxyle, acide ou amine, protégée ou non, activée ou non,

b) éventuellement, la déprotection de la fonction terminale dudit composé organosilicié utilisé à l'étape (a),

c) éventuellement, dans le cas où le support solide modifié porte des fonctions acide carboxylique terminales, l'activation de ces fonctions,

d) éventuellement, la déprotection des chaînes latérales et de l'amine terminale du composé peptidique fusogène tel que précédemment défini,

e) éventuellement, dans le cas où le support solide modifié porte des fonctions hydroxy ou amine terminales, l'activation de la fonction acide carboxylique terminale du composé peptidique fusogène tel que précédemment défini,

f) la mise en contact du support solide modifié obtenu aux étapes (a), (b) ou (c) par immersion, pendant une durée déterminée, avec une ou plusieurs solutions, dans un ou plusieurs solvants polaires, du (ou des) composé(s) peptidique(s) tel(s) que précédemment défini(s) à immobiliser,

g) éventuellement, le lavage du support sur lequel sont immobilisés ledit (ou lesdits) composé(s) peptidique(s) suite à l'étape (f).

L'étape (b) de traitement peut par exemple être un traitement basique et éventuellement par ultrasons afin d'éliminer les composés organosiliciés seulement adsorbés en surface.

Les étapes (c) et (e) d'activation des fonctions acide carboxylique peuvent par exemple être effectuées à l'aide d'une solution de N-hydroxysuccinimide ou de carbodiimide, ou encore tout  
5 autre réactif d'activation convenable et connu de l'homme du métier.

L'étape (f) est réalisée dans des conditions de température de 0 à 70°C et dans une gamme de pression satisfaisante. Au cours de l'étape (f), il  
10 est bien entendu que, pour solubiliser les composés peptidiques, toute solution permettant une bonne solubilité de ces derniers et un contrôle de l'évaporation de la solution sera utilisée. La fixation des composés peptidiques au cours de l'étape (f) pourra  
15 être suivie par différentes méthodes optiques ou spectroscopiques (vibrationnelle, UV visible), imagerie Infra-Rouge ou Raman, Microscopie à force atomique, ellipsométrie...

Les composés peptidiques fusogènes  
20 susceptibles d'être utilisés aux étapes (d), (e) ou (f) peuvent être utilisés seuls ou en mélange.

Lors de l'étape (g) de lavage notamment dans un bain d'eau osmosée, le support sur lequel les composés peptidiques sont greffés peut être soumis à  
25 des ultrasons et ce, pour éliminer, sans fragiliser la couche greffée, les composés peptidiques seulement adsorbés sur le support.

La présente invention concerne également un  
30 procédé pour immobiliser au moins une cellule et/ou au

moins une partie de cellule. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

a') la préparation d'un support selon un procédé tel que défini précédemment,

5 b') la préparation d'une suspension cellulaire contenant au moins une cellule ou au moins une partie de cellule,

c') la mise en contact du support solide tel que préparé à l'étape (a') par immersion pendant  
10 une durée indéterminée dans la suspension cellulaire préparée à l'étape (b'),

d') au moins un lavage du support obtenu à l'étape (c') sur lequel est immobilisée ladite cellule ou ladite partie de cellule.

15 La préparation d'une suspension cellulaire à l'étape (b') est avantageusement réalisée en diluant les cellules ou parties de cellule dans un tampon susceptible de conserver l'intégrité des cellules et des membranes cellulaires. Préalablement à cette étape  
20 (b'), les cellules peuvent être soumises à différents traitements tel qu'une centrifugation, un lavage ou une concentration. Ces cellules et parties de cellules comme des membranes cellulaires sont telles que décrites ci-après.

25 L'étape (c') est avantageusement réalisée dans des conditions de température allant de 0 à 50°C et de pression convenable.

30 Dans le cadre de la présente invention, on entend par « cellule », aussi bien une cellule de type procaryote que de type eucaryote. Parmi les cellules

eucaryotes, la cellule peut être une levure telle qu'une levure du genre *Saccharomyces* ou *Candida*, une cellule de mammifères, une cellule végétale ou une cellule d'insectes. Les cellules de mammifères peuvent  
5 notamment être des cellules tumorales, des cellules de lignée somatique normale ou des cellules souches. Il peut s'agir de manière non exclusive de globules rouges, d'ostéoblastes, de cellules neuronales, d'hépatocytes, de cellules musculaires, des lymphocytes  
10 ou de cellules progénitrices. Les cellules de type procaryote sont des bactéries qui peuvent être des gram + ou -. Parmi ces bactéries, on peut citer, à titre d'exemples et de façon non-exhaustive, les bactéries appartenant aux embranchements des spirochètes et des  
15 chlamydiae, les bactéries appartenant aux familles des entérobactéries (telles que *Escherichia coli*), des streptococcacées (telles que streptococcus), des micrococcacées (telles que staphylococcus), des légionelles, des mycobactéries, des bacillacées et  
20 autres.

Les cellules mises en œuvre dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues à partir d'une culture cellulaire primaire ou d'une culture d'une lignée cellulaire ou à partir d'un échantillon  
25 d'un fluide tel que de l'eau ou un fluide biologique préalablement extrait d'un corps humain ou animal, ledit échantillon pouvant avoir subi différents traitements préalables comme une centrifugation, une concentration, une dilution ...

30 Par « partie de cellule », on entend dans le cadre de la présente invention notamment

l'intégralité ou une portion de la membrane cellulaire dans laquelle le composé fusogène et notamment le peptide fusogène, ses dérivés ou ses fragments tels que précédemment définis viennent s'ancrer. Par « membrane cellulaire », on entend dans le cadre de la présente invention aussi bien la membrane plasmique riche en phospholipides des cellules eucaryotes (également appelée membrane cytoplasmique, plasmalemma ou membrane plasmatique) que la membrane plasmique et la paroi cellulaire glucidique (contenant du peptidoglycane) des bactéries ou des cellules de plantes.

Les parties de cellules mises en œuvre dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues à partir de cellules issues d'une culture cellulaire ou d'un échantillon d'un fluide tels que précédemment définis. L'homme du métier connaît différentes techniques permettant d'obtenir, à partir de cellules ou de cultures cellulaires, des membranes cellulaires, des parties de membranes cellulaires, des fractions riches en membranes cellulaires telles que la technique de partage de phase.

La présente invention concerne également un support solide susceptible d'être préparé par le procédé de préparation selon l'invention et/ou susceptible d'être obtenu après immobilisation d'une cellule et/ou partie de cellule sur ce dernier. La présente invention concerne aussi un kit de diagnostic contenant au moins un support solide selon l'invention.

Dans une première forme de mise en œuvre, la présente invention concerne un support solide tel

que précédemment défini sur lequel est fixé un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires, ledit composé étant éventuellement ancré dans au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule telles que précédemment décrites. Le support selon cette première forme de mise en œuvre est remarquable de par le fait qu'il peut être conservé avant toute utilisation. Il peut notamment être congelé, séché ou lyophilisé. L'homme du métier connaît différentes techniques de conservation n'affectant pas la structure protéique du composé fusogène fixé sur ledit support.

Dans une seconde forme de mise en œuvre, la présente invention concerne un support solide tel que précédemment défini sur lequel est fixé un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires, ledit composé étant ancré dans au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule telles que précédemment décrites. Dans cette forme de mise en œuvre, on peut parler d'un support solide activé i.e. activé par les cellules ou parties de cellule ancrées sur ledit support au moyen du composé fusogène.

Le support objet de la présente invention décrit permet une immobilisation rapide, simple, reproductible, aspécifique, homogène, d'éléments cellulaires donnés et peut être utilisé pour la détection :

- de cellules venant s'immobiliser grâce aux composés fusogènes décorant le support solide (première forme de mise en œuvre ci-dessus),

- d'anticorps ou de ligands respectivement spécifiques d'antigènes ou de récepteurs présents sur les cellules ou parties de cellule immobilisées sur le support solide (seconde forme de mise en œuvre ci-  
5 dessus),

- de composés à activité thérapeutique potentielle en les testant sur des cellules ou parties de cellule immobilisées sur le support solide, par exemple, des cellules cancéreuses (seconde forme de  
10 mise en œuvre ci-dessus).

La présente invention trouve une application particulièrement intéressante dans le domaine du diagnostic biomédical ou de la surveillance  
15 sanitaire de fluides biologiques ou destinés à l'usage humain ou animal.

La présente invention se rapporte à l'utilisation, pour l'immobilisation d'éléments biomoléculaires ou cellulaires, d'un support solide  
20 éventuellement modifié par une monocouche assemblée organisée d'un ou plusieurs composés organométalliques tels que, par exemple, les organosiliciés et aux procédés d'analyse par des méthodes optiques ou spectroscopiques de ces éléments biologiques.

25 Par conséquent, la présente invention concerne l'utilisation d'un support solide tel que précédemment défini dans le cadre d'une veille sanitaire. En effet, les différents composés fusogènes susceptibles d'être utilisés s'insèrent dans la  
30 membrane cellulaire de façon aspécifique. Il est donc possible d'utiliser le support présentant le composé

fusogène dans le cadre d'une veille sanitaire visant à vérifier la présence ou non de cellules contaminantes du type bactéries dans un fluide. La présente invention permet de concentrer la cible pour la rendre décelable.

5 Cette veille sanitaire peut notamment consister en un contrôle de la qualité microbiologique de l'eau ou en un contrôle microbiologique industriel.

La présente invention concerne l'utilisation d'un support solide tel que précédemment  
10 défini et/ou d'un procédé d'immobilisation d'au moins une cellule et/ou partie de cellule sur un support solide dans la recherche d'anticorps et/ou de ligands respectivement spécifiques d'antigènes ou de récepteurs présents à la surface des cellules ou parties de  
15 cellule fixées audit support. Cette forme de mise en œuvre est particulièrement intéressante dans le cas de la recherche d'auto-anticorps lorsqu'il y a suspicion de maladie auto-immune telle que la maladie de Hashimoto ou dans le cas de la recherche d'anticorps  
20 irréguliers acquis secondairement notamment en vue d'une transfusion sanguine. Dans cette forme de mise en œuvre particulière, deux variantes peuvent être envisagées :

- soit sont fixés, au support solide via le  
25 composé fusogène, des érythrocytes dont le groupe et/ou le phénotypage sont connus et le support solide ainsi activé est mis en présence d'un fluide préalablement extrait d'un individu tel qu'un mammifère dont on cherche à définir le groupe et/ou le phénotypage, ledit  
30 fluide étant avantageusement du sérum sanguin,

- soit sont fixés, au support solide via le composé fusogène, des érythrocytes d'un individu tel qu'un mammifère dont on cherche à définir le groupe et/ou le phénotypage sanguin et le support solide ainsi  
5 activé est mis en présence d'un fluide contenant au moins un anticorps anti-rhésus ou dirigé contre l'antigène défini.

La détection d'un anticorps sur la cellule ou partie de cellule peut être effectuée par  
10 différentes méthodes optiques ou spectroscopiques (vibrationnelle, UV visible), imagerie Infra-Rouge ou Raman, Microscopie à force atomique, ellipsométrie...

En effet, tous ces différents composants possèdent des signatures spectrales caractéristiques  
15 permettant leur détection. Il est possible de réaliser un système de détection différentiel permettant d'observer la présence ou non de biomolécules fixées, de façon spécifique, sur les éléments cellulaires ou de cellules elles-mêmes ancrées au support solide via le  
20 composé fusogène. La mise en œuvre de telles techniques de détection est un travail de routine pour l'homme du métier.

A titre d'exemple, un montage simple de transmission Infra-Rouge calibré dans le domaine de  
25 fréquence caractéristique des groupes amides permettra d'obtenir rapidement le pourcentage de biomolécules fixées en comparaison à des échantillons non exposés ou non reconnus. II est aussi envisageable par l'intermédiaire de microscopie Infra-Rouge de réaliser  
30 une cartographie en imagerie du support ainsi traité. Il est donc possible de réaliser une puce par

nanotechnologie et ainsi obtenir une multitude de détections pour cibler un très grand nombre d'échantillons.

5 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples ci-après donnés à titre illustratif et non limitatif et faisant référence aux figures annexées.

#### **BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS**

10 La figure 1 est une représentation schématique de la synthèse en phase solide des peptides 1 et 2. Les étapes de déprotection et couplage sont répétées pour chaque acide aminé à incorporer. La durée d'un cycle est de 2 à 3 heures.

15 La figure 2 présente le rapport entre le spectre Infra-Rouge de matériaux en verre greffés par deux agents de jonction (composés ou bras organiques C et D) avant et après traitement à la potasse après soustraction du spectre du verre brut.

20 La figure 3 est une représentation schématique de la fixation indirecte d'un peptide sur un support solide via un bras de jonction.

La figure 4 présente le rapport entre le spectre Infra-Rouge de matériaux en verre greffés par  
25 les agents de jonction C et D puis par le peptide 1 après soustraction du spectre du verre brut.

La figure 5 présente le rapport entre le spectre Infra-Rouge des différents matériaux (verre +  
composés C et D (bras) ; verre + bras + peptide 1 ;  
30 verre + peptide 1) ayant ou non subi un traitement par

les ultrasons après soustraction du spectre du verre brut.

La figure 6 présente le rapport entre le spectre Infra-Rouge de matériaux en verre greffés par les agents de jonction C et D puis par le peptide 2 après soustraction du spectre du verre brut.

La figure 7 présente les clichés de microscopie photonique de différents supports verre mis en contact avec une suspension cellulaire puis rincés. Les clichés des figures 7A et 7B correspondent respectivement :

- à un verre fonctionnalisé par l'agent de couplage que sont les agents de jonction C et D puis par le peptide 1,

- à un verre fonctionnalisé par l'agent de couplage que sont les agents de jonction C et D puis par le peptide 2.

La figure 8 est une représentation schématique du biorécepteur tel que visualisé sur le cliché de la figure 7B sur lequel sont fixés des anticorps spécifiques des antigènes membranaires des érythrocytes.

La figure 9 présente les clichés de microscopie électronique à balayage de différents supports silicium oxydé mis en contact avec une suspension cellulaire puis rincés. Les clichés des figures 9A à 9D correspondent respectivement :

- à un support silicium oxydé après traitement UV,

- à un support silicium fonctionnalisé par les agents de jonction C et D,

- à un support silicium fonctionnalisé par les agents de jonction C et D puis par le peptide 1,
- à un support silicium fonctionnalisé par les agents de jonction C et D puis par le peptide 2.

5

## **EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS**

### **I. Synthèse peptidique.**

Deux peptides synthétisés au laboratoire ont été utilisés :

10           - le peptide fusogène 519-541 correspondant à l'extrémité NH<sub>2</sub> de la protéine Gp41 du virus du V.I.H. (peptide **2**) dont la séquence est la suivante : AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS (SEQ ID NO: 1 dans la liste de séquences en annexe),

15           - le peptide de synthèse, issu de la protéine Gp46 du virus H.T.L.V.-1 (peptide **1**) dont la séquence (séquence 242-261) est la suivante : SPNVSVSSSTPLLYPSLA (SEQ ID NO: 7 dans la liste de séquences en annexe).

20           Le peptide **1** est particulièrement intéressant. En effet, il existe un anticorps spécifiquement dirigé contre ce peptide **1** (appelé DB4), ce qui permet d'évaluer la conservation de sa fonctionnalité après greffage.

25

Une synthèse peptidique en phase solide (S.P.P.S.) selon la stratégie Fmoc a été utilisée pour synthétiser ces deux peptides.

30           Selon la stratégie S.P.P.S., la synthèse s'effectue de façon récurrente à partir du premier aminoacide, ancré sur le support solide par sa fonction

carboxylique (étape 1, **Figure 1**). Le groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyle Fmoc (baso-labile) est utilisé pour la protection temporaire de la fonction  $\alpha$ -aminée. La libération de cette fonction est l'étape suivante de la synthèse (étape 2). Le deuxième aminoacide, dont la fonction  $\alpha$ -carboxylique a été préalablement activée, est couplé avec le groupe  $\alpha$ -amino libre de l'acide immobilisé sur la résine (étape 3). Les étapes 2 et 3 sont répétées pour chaque résidu à incorporer.

Les synthèses ont été réalisées dans les conditions standards du protocole Fmoc à l'aide d'un synthétiseur automatique et en débutant la chaîne de réaction par un aminoacide greffé sur une résine de type Wang. Les réactions de couplage ont été effectuées dans la N-méthylpyrrolidone (NMP), solvant aprotique polaire qui permet une solvataion maximale de l'ensemble peptide-résine. Cette résine présente un taux de présubstitution d'environ 0,5-0,75 mmol.g<sup>-1</sup>. Elle est constituée de billes de polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisée par l'alcool p-benzyloxybenzylique (bras) qui permet la liaison au premier aminoacide.

## 25 **II. Préparation du support fonctionnalisé.**

### II.1. Préparation du support en verre au greffage.

Le support solide choisi est un support inorganique en verre ayant subi un traitement permettant l'obtention d'une surface propre et réactive.

En effet, il est nécessaire d'effectuer un nettoyage efficace avant tout greffage, nettoyage qui ne doit toutefois pas altérer la nature de la surface. Pour cela, un détergent alcalin « Hellmanex II » a été employé afin d'optimiser le nettoyage. L'état de surface du matériau est observé en moyen Infra-Rouge par transmission après une immersion de 15 minutes à 50°C dans une solution aqueuse d'Hellmanex à 2%. Le matériau est ensuite rincé à l'aide d'eau osmosée, puis un traitement à l'aide de jets d'eau osmosée est appliqué systématiquement. L'analyse des plaques après ce nettoyage a permis de constater la disparition des bandes caractéristiques de la pollution organique (groupements CH<sub>3</sub> (2955 et 2875 cm<sup>-1</sup>) et CH<sub>2</sub> (2920 et 2850 cm<sup>-1</sup>)).

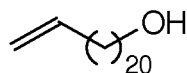
## II.2. Préparation des composés organiques.

Après conditionnement du support solide en verre au greffage, des bras organiques destinés à fonctionnaliser ledit support ont été synthétisés. L'utilisation de bras d'une longueur supérieure à 17 carbones a été choisie afin d'obtenir des couches denses entraînant une bonne protection de la liaison siloxanique (Si-O-Si) tout en conservant une bonne réactivité de la fonction terminale. Des molécules trichlorosilylées, de longueur suffisante et possédant une extrémité fonctionnelle, ne sont pas commerciales. La synthèse de bras possédant de telles propriétés et notamment une fonction alcool pour l'extrémité fonctionnelle permettant la fixation ultérieure d'un peptide a été entreprise.

a. Synthèse de l'acétate de docos-21-ènyle.i. *Docos-21-èn-1-ol.*

La réaction fréquemment utilisée pour  
5 obtenir une longue chaîne carbonée est le couplage de  
deux chaînes *via* deux carbones  $sp^3$ . Les réactions  
d'hétérocouplages sont réalisées entre un réactif de  
Grignard et un halogénure en utilisant un catalyseur à  
base de cuivre par exemple du  $LiCuCl_4$  ou de l'iodure de  
10 cuivre I.

Le docos-21-èn-1-ol est de formule :



$$MM = 324,60 \text{ g.mol}^{-1}$$

Première étape : Formation du 11-bromo  
15 magnésium-1-undécène

A une solution de THF anhydre contenant  
2,7g (107 mmoles) de magnésium sous forme de tournures,  
est ajoutée, goutte à goutte, une solution de 5g (21,4  
mmoles) de 11-bromo-1-undécène dans 21 ml de THF. Cette  
20 réaction est réalisée sous atmosphère inerte.  
L'exothermie de la réaction est régulée à l'aide d'un  
bain de glace. Puis, 5 ml de dibromoéthane sont ajoutés  
à ce mélange. La réaction est maintenue active pendant  
une heure et le surnageant est prélevé à l'aide d'une  
25 seringue puis placé dans un ballon sous atmosphère  
inerte.

Deuxième étape : Formation de l'alcoolate  
de lithium

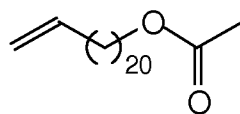
A une solution de THF anhydre sont ajoutés 5,4g (21,4 mmoles) de 10-bromo-undécanol. La solution est placée à -78°C sous atmosphère inerte, puis à l'aide d'une ampoule équi-pression, 0,71 ml (23,45 mmoles) de méthyl-lithium est ajouté puis la réaction est laissée progressivement revenir à température ambiante.

Troisième étape : Formation du docos-21-èn-1-ol

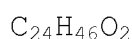
10 A la solution contenant le 11-bromo-magnésium-1-undécène refroidie à -78°C, 0,21g (1,1 mmoles) d'iodure de cuivre est additionné. La solution contenant le dérivé lithien y est ajoutée goutte à goutte par l'intermédiaire d'une canule. Le mélange est  
15 agité pendant une heure à cette température, puis 15 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de 40 ml d'éthanol absolu ; un précipité noir se forme. Ce dernier est accentué par l'ajout de 3 ml d'HCl 10%. Après filtration sur fritté 1, la  
20 solution limpide obtenue est extraite trois fois à l'aide de diéthyl-éther. La phase étherée restante est alors lavée à l'eau puis avec une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>. La phase organique est alors récupérée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée par évaporation des solvants  
25 sous pression réduite. Le résidu restant est finalement reprécipité dans l'acétone anhydre. Après filtration sur fritté 4, 4,86g (rdt = 70%) de docos-21-èn-1-ol sont obtenus.

30 ii. Acétate de docos-21-ènyle.

L'extrémité OH du docos-21-èn-1-ol est ensuite acétylée par l'anhydride acétique dans du dichlorométhane pour conduire à l'acétate de docos-21-ènyle de formule :



5



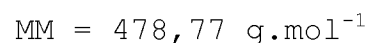
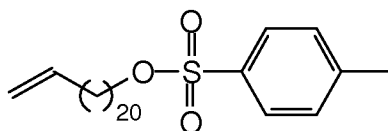
$$MM = 366,63 \text{ g.mol}^{-1}$$

A 2g (6 mmoles) de docos-21-èn-1-ol sont ajoutés 20 ml de pyridine anhydre. Après quelques minutes d'agitation, la solution est refroidie par un bain de glace et 0,7 ml (7,2 mmoles) d'anhydride acétique est ajouté. Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 12 heures. La pyridine est alors co-évoluée à l'aide de toluène anhydre, puis le résidu est noyé dans 30 ml de dichlorométhane. Cette solution est lavée 3 fois à l'aide d'une solution aqueuse saturée en hydrocarbonate de sodium. Les phases organiques sont rassemblées après séchage sur  $MgSO_4$ , les solvants sont évaporés sous pression réduite. Une poudre blanche est récupérée. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol (98/2, v/v), 1,34g (rdt = 62%) d'acétate de docos-21-ènyle ci-après désigné **composé organique A** sont récupérés sous forme d'une huile translucide qui durcit et blanchit à température ambiante.

b. Synthèse du 1-O-acétyl-10-O-[1-docos-21-ényle] triéthylèneglycol.

i. *Tosylate de docos-21-ène.*

L'activation de l'extrémité hydroxyle du docos-21-èn-1-ol, par action de chlorure de tosyloxy en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane à  
 5 température ambiante a permis d'obtenir du tosylate de docos-21-ène de formule :

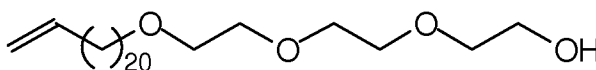


10 A une solution de 4g (12 mmoles) de docos-21-èn-1-ol dans 4 ml de triéthylamine anhydre et 30 ml de dichlorométhane anhydre, sont ajoutés, sous azote et à température ambiante, 4,6g (24 mmoles) de chlorure de tosylate lui-même dilué dans 30 ml de dichlorométhane.  
 15 Le mélange jaunâtre est agité pendant 12 heures. Après filtration sur fritté 4 et évaporation des solvants sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane à 100%. 3,4g (rdt = 60%) de  
 20 tosylate de docos-21-ène sont récupérés.

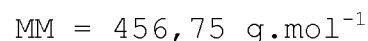
ii. *2-(2-(2-(docos-21-ényloxy)ethoxy)ethoxy)ethanol.*

A 1,9g (12,6 mmoles) de triéthylène glycol en solution dans 30 ml de THF anhydre sont additionnés  
 25 83mg (2,1 mmoles) d'hydruure de sodium à 60% dans l'huile. Après 15 minutes d'agitation sous azote, 1g (2,1 mmoles) du composé 6 en solution dans 40 ml de THF

est ajouté goutte à goutte. Le mélange est alors porté au reflux du THF pendant 12 heures. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur fritté 4, les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol (98/2, v/v). Est récupéré 0,64g (rdt = 67%) de 2-(2-(2-(docos-21-ényloxy)ethoxy)ethoxy)ethanol de formule :



10



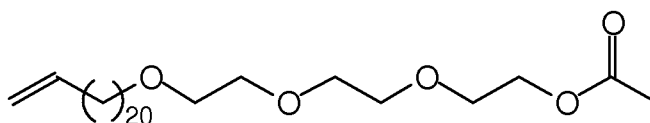
iii. 2-(2-(2-(docos-21-ényloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl acetate

15

Dans une solution de 20 ml de dichlorométhane est dissous 0,5g (1 mmole) de 2-(2-(2-(docos-21-ényloxy)ethoxy)ethoxy)ethanol, puis 0,26 ml (2,7 mmoles) d'anhydride acétique est ajouté. La solution est agitée sous azote pendant une heure puis au reflux du dichlorométhane pendant 12 heures. Après retour à température ambiante, la solution est extraite 3 fois à l'aide 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée 3 fois à l'aide d'une solution aqueuse saturée en hydrocarbonate de sodium. Après séchage sur  $MgSO_4$  et évaporation des solvants sous pression réduite de la phase organique, une pâte jaunâtre est récupérée. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol (98/2,

25

v/v), est récupéré 0,45g (**rdt = 90%**) de 1-O-acétyl-10-O-[1-docos-21-ényl] Triéthylèneglycol (ou acétate de 2-[2-(2-docos-21-ényloxy-éthoxy)-éthoxy]-éthyle) ci-après désigné **composé organique B** de formule :



5

 $C_{30}H_{58}O_5$ MM = 498,79 g.mol<sup>-1</sup>

c. Hydrosilylation des composés organiques

A et B.

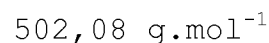
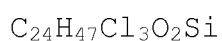
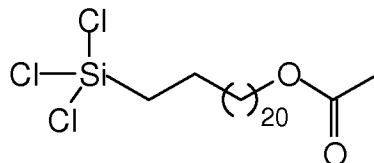
10 Les composés organiques **A** et **B** possèdent à l'une de leurs extrémités une insaturation. Cette double liaison a été fonctionnalisée à l'aide de chlorosilane pour fixer dans un deuxième temps ces bras au support de verre.

15 Cette hydrosilylation a été effectuée par réaction du trichlorosilane sur **A** et **B** dans du toluène en présence du catalyseur de Kärsted.

20 Le composé organique **A** (200mg (0,5 mmole)) est placé dans un tube de Schenck ayant été préalablement purgé par commutation alternative entre une rampe à vide et une rampe argon. Après addition de 2 ml de toluène fraîchement distillé, la solution est soumise à une agitation, sous argon, jusqu'à complète dissolution du solide. Puis 300µl de trichlorosilane  
25 fraîchement distillé sont ajoutés ainsi que 2 gouttes du catalyseur de Kärsted. La solution devenue jaune pâle est agitée 2 heures à 40°C. Après évaporation sous pression réduite, un solide brut est obtenu puis est

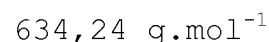
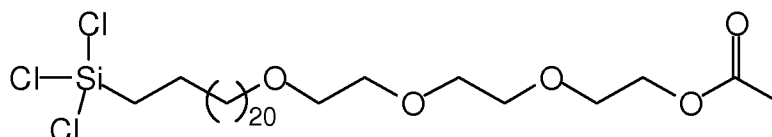
utilisé dans l'état dans l'étape de greffage. Ce solide correspond à l'acétate de 22-(trichlorosilanyl)-docosyle ci-après désigné **composé organique C** de formule :

5



A partir du composé organique B et dans les mêmes conditions opératoires, est obtenu le **composé organique D** correspondant au 1-O-Acétyl-10-O-[22-(trichlorosilanyl)-docosyl] triéthylèneglycol de formule :

15



d. Greffage des composés organiques sur le support verre.

Après avoir validé le greffage exclusif du **composé C** puis celui du **composé D**, a été entrepris le greffage en mélangeant les deux types de composés et en utilisant un mélange équimolaire dans le but d'obtenir une surface présentant une densité moyenne de sites actifs vis-à-vis du peptide.

Ainsi, après nettoyage, les matériaux en verre sont introduits dans un réacteur. Cette enceinte permet de sécher le matériau à une température contrôlée en évitant toute contamination organique postérieure au nettoyage ; celle-ci est fréquemment rencontrée lors des séchages en étuve. Ce type de réacteur à double enveloppe sera également utilisé pour réaliser l'étape de silanisation qui doit se dérouler sous atmosphère inerte et à température fixe. Ceci est possible à l'aide d'un système externe de refroidissement avec régulateur thermique.

Les composés chlorosilylés **C** et **D** (concentration finale de chaque composé  $6.10^{-3}$  M) sont solubilisés dans le mélange hexane/chloroforme, 90/10. Cette solution dite de "silanisation" est alors introduite dans le réacteur où se trouvent les matériaux. Le schéma 1 ci-après présente la réaction de greffage sur verre du composé C.

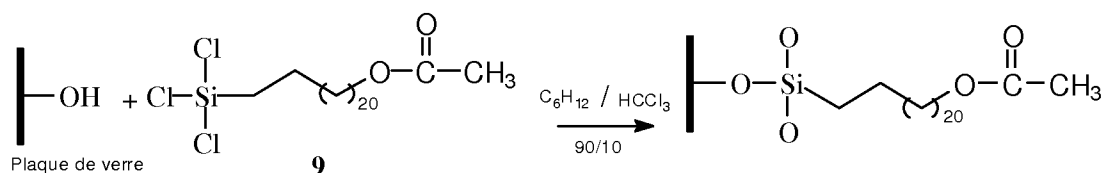


Schéma 1

20

Après une nuit d'immersion, les matériaux sont retirés de l'enceinte et plongés dans un bain d'eau osmosée soumis à des ultrasons sur une durée de cinq minutes. Ce type de traitement permet d'éliminer les composés organosiliciés seulement adsorbés sur le support sans fragiliser la couche greffée.

25

L'étape suivante est la déprotection de la fonction OH par saponification des **composés C** et **D**

fixés sur support en utilisant la potasse alcoolique à 0,5 M. Les matériaux sont immergés dans cette solution de KOH pendant 20 minutes. Les supports sont ensuite retirés et les impuretés sont éliminées par 3  
5 traitements successifs de 3 minutes par ultrasons dans un bain d'eau osmosée. Les matériaux sont alors séchés sur papier adsorbant. Le schéma 2 ci-après correspond à la réaction de déprotection de la fonction ester après greffage du composé C.

10

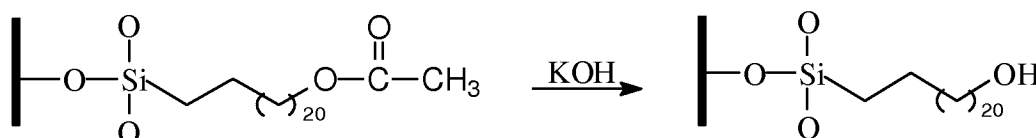


Schéma 2

De plus, en présence d'un greffage hétérogène, KOH pénètre au sein de la couche greffée, et rompt les liaisons liant les bras organosiliciés à la surface. Dans le cas d'un greffage homogène, les molécules de cette base forte ne trouvent pas d'espace entre les molécules greffées pour atteindre la surface. Le greffage du matériau inorganique restera donc  
15 intact. L'utilisation de potasse alcoolique permet donc aussi de tester l'homogénéité du greffage.  
20

Afin de valider le greffage des composés C et D, ont, tout d'abord, été observées les variations d'hydrophobie / hydrophilie de la surface par l'étude de l'angle de contact d'une goutte d'eau avant, après  
25 réaction de silanisation et après saponification. Les résultats de cette analyse de la mouillabilité sont présentés au Tableau 1.

Type	Nombre de tests		Angle moyen obtenu (°)
<b>Verre brut</b>	35	<b>Moyenne</b>	<b>11,66</b>
		Ecart-type	2,61
<b>Verre greffé avant traitement KOH</b>	30	<b>Moyenne</b>	<b>74,06</b>
		Ecart-type	2,70
<b>Verre greffé après traitement KOH</b>	30	<b>Moyenne</b>	<b>51,12</b>
		Ecart-type	2,73

Tableau 1

Une forte augmentation de l'angle de contact après le greffage (verre brut versus verre traité) est obtenue, ce qui confirme la présence d'une couche aliphatique hydrophobe apparue en surface. De plus, après traitement à la potasse alcoolique, la baisse de cet angle validant le passage à une surface rendue plus hydrophile après élimination de la fonction ester. Ce type d'analyse est donc un bon indicateur de la variation de l'état de surface.

Cependant afin d'obtenir des informations plus précises sur les éléments greffés, une analyse par Infra-Rouge en transmission a été réalisée afin de caractériser le nombre d'onde correspondant aux groupements CH<sub>2</sub> des chaînes aliphatiques des composés C et D greffés. Les spectres obtenus sont présentés sur la **Figure 2**.

L'analyse confirme la présence en surface de la longue chaîne aliphatique par l'observation des bandes caractéristiques des liaisons CH<sub>2</sub> ( $\nu_{as} = 2923\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_s = 2853\text{cm}^{-1}$ ) De plus, l'intensité des bandes obtenues

ici ( $\Delta DO = 3.10^{-3}$ ) est comparable à la simulation effectuée d'une monocouche d'arachidate sur verre ( $\Delta DO = 2,5.10^{-3}$ ). Ceci semble donc bien indiquer la formation en surface du support d'une monocouche des **composés C** et **D**. La couche greffée est suffisamment compacte et dense pour empêcher la pénétration de la potasse alcoolique au sein de la couche.

Sur la Figure 3, on observe également un décalage du spectre après traitement à la potasse alcoolique vers les basses fréquences. Ainsi, il semble que la présence du groupe ester avant saponification ne permet pas aux chaînes de s'orienter les unes par rapport aux autres. Après traitement à la potasse alcoolique, la disparition de cet ester terminal entraîne une réorganisation des chaînes à l'intérieur de la couche.

Le support verre a donc été fonctionnalisé par les deux types de **composés C** et **D** de façon à obtenir une surface fonctionnelle à faible densité de sites actifs.

### II.3. Fixation du peptide 1.

Chaque support fonctionnalisé est placé dans un pilulier à large col, dans lequel se déroule le greffage. Un micro barreau aimanté est ajouté afin d'assurer l'agitation. Ces piluliers sont eux-mêmes placés dans le réacteur qui est ensuite fermé puis purgé par commutation alternative entre une rampe à vide et une rampe argon. Les supports se trouvent donc sous atmosphère inerte.

Sont ajoutés 8 ml de solvant de greffage à chaque pilulier situé dans le réacteur et l'agitation est lancée.

Puis est ajoutée au matériau la solution dite d'activation comportant, par unité de support, 2 mmol de HOBt et 2 mmol d'iodure de [3-(N-éthylcarbodiimide)-N-propyl]triéthylammonium (DiPC) mis en solution, sous atmosphère inerte, dans 1 ml de solvant de greffage (eau osmosée à 9 g/l de NaCl).

La solution peptidique (par support, 1 mmol de peptide 1 mis en solution sous argon dans 1 ml de solvant de greffage) est ajoutée, goutte à goutte, très lentement, sous agitation, au support préalablement immergé dans la solution d'activation. La réaction suit toujours le protocole réactionnel présenté sur la **Figure 3**.

L'agitation est maintenue 30 minutes puis arrêtée. Les supports restent immergés pendant 20 heures. Les matériaux sont ensuite retirés des piluliers et les molécules non fixées de façon covalente sont éliminées par ultrasons, par traitements successifs de 2 minutes dans de l'eau osmosée puis sont analysées comme précédemment. Le spectre obtenu est présenté sur la **Figure 4**.

L'observation du spectre met en évidence les bandes caractéristiques de l'amide I ( $\nu_{CO}$ ) et l'amide II (combinaison entre la  $\nu_{CN}$  et la  $\delta_{NH}$ ). Ceci laisse envisager la présence du peptide 1 en surface des plaques.

Les plaques de verre obtenues lors des différentes expériences ont été analysées par Infra-

Rouge en mode Réflexion spéculaire et les spectres obtenus sont présentés **Figure 5**.

Ainsi l'analyse de ces spectres révèle la présence de peptides seulement sur les plaques préalablement greffées par les **composés C** et **D**. Ceci confirmerait l'hypothèse d'un greffage covalent et non d'une simple absorption. Ainsi, les supports fonctionnels réalisés permettent la fixation de façon covalente de peptides d'intérêt biologique.

10

#### II.4. Fixation du peptide 2.

Le peptide **2** synthétisé selon la méthode décrite précédemment a été fixé en utilisant le même protocole que celui pour le peptide 1. Seule l'eau osmosée à 9 g.l<sup>-1</sup> de NaCl présente dans les solvants de greffage et d'activation a été remplacée par de l'hexafluoropropan-2-ol qui permet de solubiliser les peptides hydrophobes.

Les supports verre ainsi obtenus sont analysés par Infra-Rouge en mode réflexion spéculaire par la méthode P.M.I.R.R.A.S. (**Figure 6**). Les bandes caractéristiques des amides I et II confirment que le peptide **2** a bien été greffé selon le protocole décrit sur support verre.

25

#### III. Vérification des propriétés biologiques des peptides fixés.

Des tests ELISA ont été réalisés afin de vérifier les propriétés biologiques et notamment l'accessibilité de l'épitope et la reconnaissance spécifique d'anticorps pour les peptides fixés.

30

Ces tests ont notamment été réalisés pour le peptide **1** spécifiquement reconnu par l'anticorps DB4 en utilisant comme contrôle négatif un anticorps appelé BF6, dirigé contre une protéine du système du complément humain et ne reconnaissant pas le peptide **1**.

De plus, l'interaction antigène-anticorps dans le cas du peptide **1** et de l'anticorps DB4 a été observée par spectrométrie Infra-Rouge en transmission.

#### 10 IV. Association d'érythrocytes au support.

A été utilisé du sang obtenu auprès de l'Etablissement Français du Sang et correspondant à un culot d'hématies conservé en tampon C.P.D. (Citrate Phosphate Dextrose).

15 1 ml de ce sang est prélevé, mis en solution dans 15 ml de tampon PBS 1X puis centrifugé 5 min à 2500 tours/min. Le culot récupéré est ensuite remis en suspension dans ce même tampon. Cette opération, renouvelée trois fois, permet l'élimination  
20 d'une grande proportion des protéines plasmatiques et ce, afin de favoriser l'immobilisation cellulaire.

Différents supports en verre placés dans les puits d'une plaque 6 puits ont été ensuite immergés dans une solution d'érythrocytes à 1% dans du tampon  
25 PBS pendant 1 heure 30 sous faible agitation. Les supports sont ensuite tenus par une pince pour être agités dans 3 bains successifs de tampon PBS.

Les supports en verre ainsi rincés sont conservés dans du PBS, avant d'être placés entre lame  
30 et lamelle et être observés sous microscope photonique

NIKON optiphot 2 (Biocom visiol@b). Les clichés obtenus (x 650 objectif 50) sont présentés sur la **Figure 7**.

Cette expérience a été réalisée sur :

- 5 - Verre après traitement à l'aide d'une solution Hellmanex
- Verre fonctionnalisé par les composés organiques **C** et **D** ,
- Verre fonctionnalisé par les composés organiques **C** et **D** puis par le peptide **1** (Figure 7A),
- 10 - Verre fonctionnalisé par les composés organiques **C** et **D** puis par le peptide **2** (Figure 7B).

Aucune hématie n'est présente sur les supports verre après traitement à l'aide d'une solution Hellmanex et verre fonctionnalisé par les composés organiques **C** et **D**. De plus, aucune hématie n'est observée sur le cliché qui correspond au support sans peptide **2** fusogène (**Figure 7A**). Les érythrocytes ne présentent donc pas d'adsorption aspécifique sur le verre, les composés organiques ou le peptide **1**. Par contre, le cliché effectué sur un support comportant le peptide **2** fusogène (**Figure 7B**) présente une forte proportion d'hématies régulièrement réparties sur la plaque. La **Figure 8** schématise le biorécepteur tel que visualisé à la Figure 7B.

Ainsi, le peptide **2** fusogène a pu immobiliser les globules rouges sur le support verre. De plus, les hématies n'ont pas subi de dommages et ont conservé les formes normales de disque biconcave.

Il convient de remarquer que des résultats tout à fait similaires à ceux précédemment présentés ont été obtenus en utilisant un support en silicium oxydé au lieu d'un support en verre. En effet, des  
5 expériences identiques à celles précédemment décrites pour le verre ont été réalisées sur des supports de silicium oxydé et les résultats obtenus en microscopie à balayage sont présentés à la **Figure 9**. Aucune hématie  
n'est présente sur les plaques sans peptide 2 fusogène  
10 i.e. aucune adsorption aspécifique de ces cellules sur le silicium (Figure 9A), les agents de jonction C et D (Figure 9B) ou le peptide 1 (Figure 9C).

**REVENDICATIONS**

- 1) Procédé de préparation d'un support solide susceptible d'immobiliser au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule, ledit procédé comprenant une étape consistant à fixer audit support solide un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit composé fusogène est un composé fusogène non peptidique tel que le motif glycosyl phosphatidylinositol ou les motifs isoprènes.
- 3) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit composé fusogène est un composé fusogène peptidique.
- 4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit composé peptidique fusogène est un peptide basique dérivé de protéines virales, de facteurs de transcription ou de toxines.
- 5) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit composé peptidique fusogène est un peptide dont la composition en acides aminés comprend au moins 40% d'acides aminés hydrophobes par rapport au nombre total d'acides aminés de sa séquence.
- 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que ledit

composé peptidique fusogène est choisi dans le groupe constitué par les peptides présentant les séquences suivantes :

- 5                   - AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS (SEQ ID NO. 1 dans la liste de séquences en annexe),
  - RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO. 2 dans la liste de séquences en annexe),
  - TAALRLGIKLTQHYFGLLTAFGSNFGTIG (SEQ ID NO. 3 dans la liste de séquences en annexe),
  - 10                  - MMIMLGAICAIIVVVIVIVFFT (SEQ ID NO. 4 dans la liste de séquences en annexe),
  - RGGRLSYSRRRFSVSVGR (SEQ ID NO. 5 dans la liste de séquences en annexe),
  - C(Acm)GRKKRRQRRRQC avec C(Acm) = Cys-  
15 acétamidométhyle (SEQ ID NO. 6 dans la liste de séquences en annexe),
- leurs dérivés et leurs fragments.

7) Procédé selon l'une quelconque des  
20 revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit support solide est inorganique.

8) Procédé selon l'une quelconque des  
25 revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit support solide est choisi dans le groupe constitué par les verres, le quartz, les silices, les céramiques, les métaux et les semi-conducteurs.

9) Procédé selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit support solide ou la surface dudit support solide est

en un matériau organique comme un polymère ou une résine incluant le nylon, le polyéthylène glycol, les polycarbonates, les polyfluoropolymères ou les composites.

5

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit support solide présente une surface portant des groupes fonctionnels.

10

11) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit composé fusogène est lié de façon directe audit support solide.

15

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la liaison entre ledit composé fusogène et ledit support solide est indirecte.

20

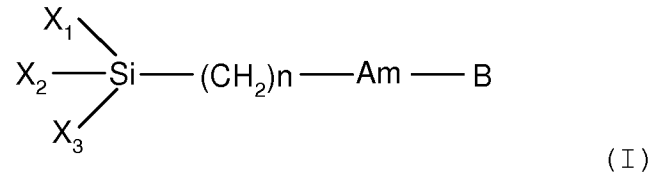
13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ladite fixation indirecte dudit composé fusogène sur ledit support solide est réalisée au moyen d'une monocouche autoassemblée organisée d'un ou de plusieurs composés organiques ou organométalliques possédant une chaîne alkyle terminée par un groupe fonctionnel.

25

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite monocouche autoassemblée

30

organisée comprend un ou plusieurs composés organosiliciés répondant à la formule I suivante :



dans laquelle

- 5
- n est compris entre 3 et 40,
  - m est égal à 1,
  - $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  qui peuvent être identiques ou différents entre eux sont sélectionnés dans le groupe constitué par des groupes alkyles saturés en  $C_1$  à  $C_6$ ,
- 10 linéaires ou ramifiés, et des groupements hydrolysables, au moins l'un de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  représentant un groupement hydrolysable,
- A représente le groupement  $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k-$   $(\text{CH}_2)_i-$  dans lequel k est compris entre 1 et 100, et i
- 15 un nombre entier supérieur ou égal à 0
- m étant égal à 1 et  $k \geq 1$ 
    - si  $i = 0$ , alors B représente un groupement  $-\text{R}_1$ ,  $-\text{COR}_1$ ,  $-\text{COOR}_1$ ,  $-\text{CONR}_1\text{R}_2$ ,
    - si  $i \geq 1$ , alors B représente un
- 20 groupement  $-\text{OR}_1$ ,  $-\text{OCOR}_1$ ,  $-\text{NR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{COOR}_1$ ,  $-\text{CONR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{SR}_1$  ou un atome d'halogène.
- $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  peuvent être identiques ou différents représentant un atome d'hydrogène, une chaîne hydrocarbonée éventuellement substituée, saturée
- 25 ou insaturée et linéaire ou ramifiée comprenant 1 à 24 atomes de carbone ou un groupement aromatique.

15) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

5 a) la préparation d'un support solide tel que défini à l'une quelconque des revendications 7 à 10, modifié par une monocouche autoassemblée comprenant au moins un composé organosilicié répondant à la formule I telle que définie à la revendication 14, ledit composé organosilicié présentant à son extrémité  
10 un halogène, une fonction hydroxyle, acide ou amine, protégée ou non, activée ou non,

b) éventuellement, la déprotection de la fonction terminale dudit composé organosilicié utilisé à l'étape (a),

15 c) éventuellement, dans le cas où le support solide modifié porte des fonctions acide carboxylique terminales, l'activation de ces fonctions,

d) éventuellement, la déprotection des chaînes latérales et de l'amine terminale d'un composé peptidique tel que défini dans l'une quelconque des  
20 revendications 3 à 6,

e) éventuellement, dans le cas où le support solide modifié porte des fonctions hydroxy ou amine terminales, l'activation de la fonction acide carboxylique terminale d'un composé peptidique tel que  
25 défini dans l'une quelconque des revendications 3 à 6,

f) la mise en contact du support solide modifié obtenu aux étapes (a), (b) ou (c) par immersion, pendant une durée déterminée, avec une ou  
30 plusieurs solutions, dans un ou plusieurs solvants polaires, du (ou des) composé(s) peptidique(s) tel(s)

que défini(s) dans l'une quelconque des revendications 3 à 6 et éventuellement après les étapes (d) et/ou (e),  
g) éventuellement, le lavage dudit support sur lequel sont immobilisés ledit (ou lesdits) composé(s) peptidique(s) suite à l'étape (f).

16) Procédé pour immobiliser au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

a') la préparation d'un support selon un procédé tel que défini selon l'une quelconque des revendications précédentes,

b') la préparation d'une solution cellulaire contenant au moins une cellule ou au moins une partie de cellule,

c') la mise en contact du support solide tel que préparé à l'étape (a') par immersion pendant une durée indéterminée dans la solution cellulaire préparée à l'étape (b'),

d') au moins un lavage du support obtenu à l'étape (c') sur lequel est immobilisée ladite cellule ou ladite partie de cellule.

17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote choisie parmi une levure, une cellule de mammifères, une cellule végétale ou une cellule d'insectes.

18) Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite cellule de mammifères est choisie parmi les globules rouges, les ostéoblastes, les cellules neuronales, les hépatocytes, les lymphocytes, les cellules musculaires et les cellules progénitrices.

19) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule procaryote telle qu'une bactérie.

20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que la partie de cellule est constituée de l'intégralité ou d'une portion d'une membrane cellulaire.

21) Support solide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 7 à 10, sur lequel est éventuellement greffée une monocouche autoassemblée organisée telle que définie à l'une quelconque des revendications 13 ou 14, et sur lequel est fixé un composé fusogène capable de s'insérer dans les membranes cellulaires tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, ledit composé fusogène étant éventuellement ancré dans au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule telles que définies dans l'une quelconque des revendications 17 à 20.

22) Support solide selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit composé fusogène est

ancré dans au moins une cellule et/ou au moins une partie de cellule telles que définies dans l'une quelconque des revendications 17 à 20.

5                   23) Kit de diagnostic comprenant au moins un support solide selon l'une quelconque des revendications 21 ou 22.

10                   24) Utilisation d'un support selon la revendication 21 dans le cadre d'une veille sanitaire.

15                   25) Utilisation d'un support selon la revendication 22 et/ou d'un procédé d'immobilisation d'au moins une cellule et/ou d'au moins une partie de cellule tel que défini dans l'une quelconque des revendications 16 à 20 dans la recherche d'anticorps et/ou de ligands respectivement spécifiques d'antigènes ou de récepteurs présents à la surface des cellules ou parties de cellule fixées audit support.

20

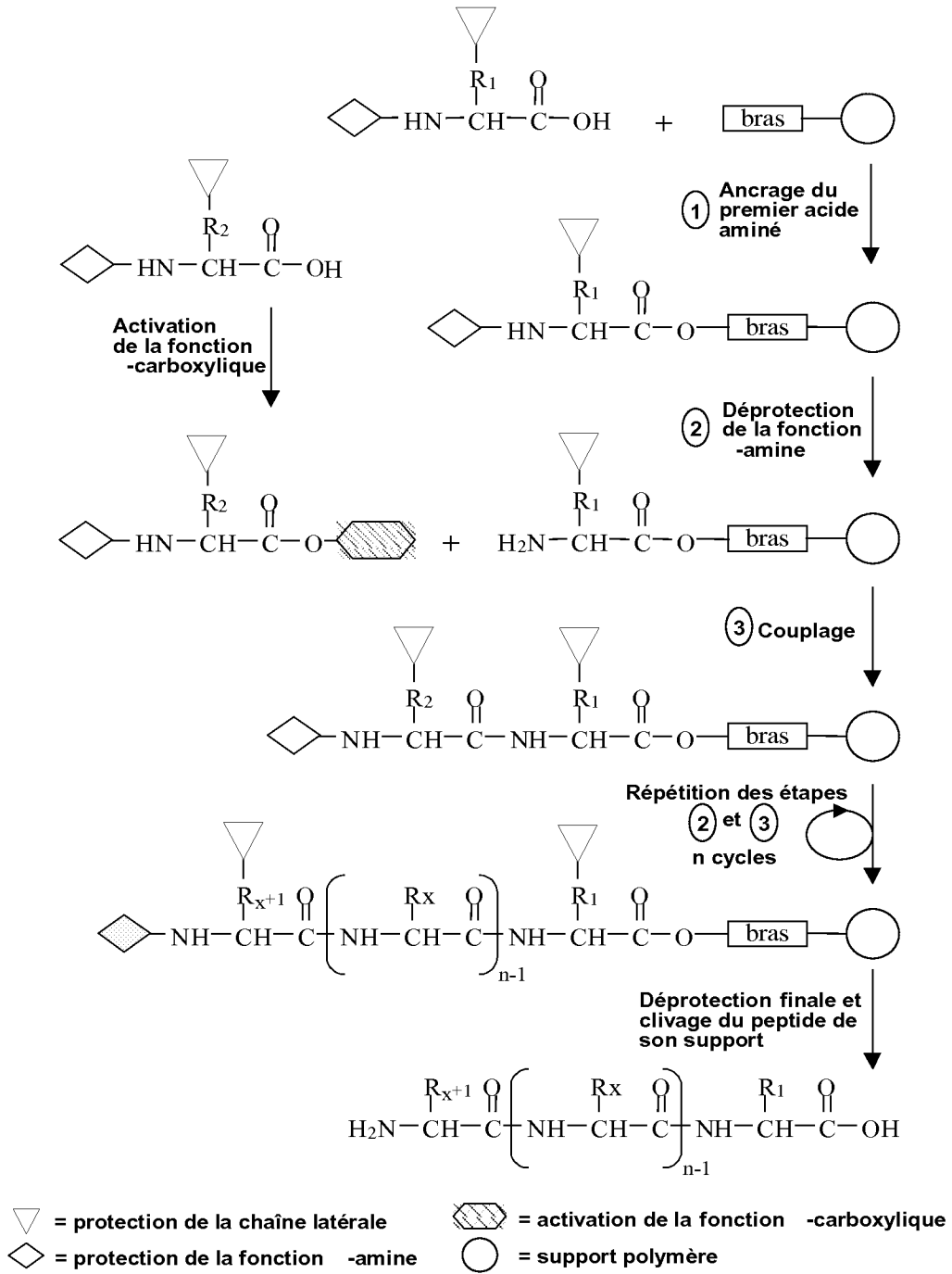


FIG.1

FIG.2

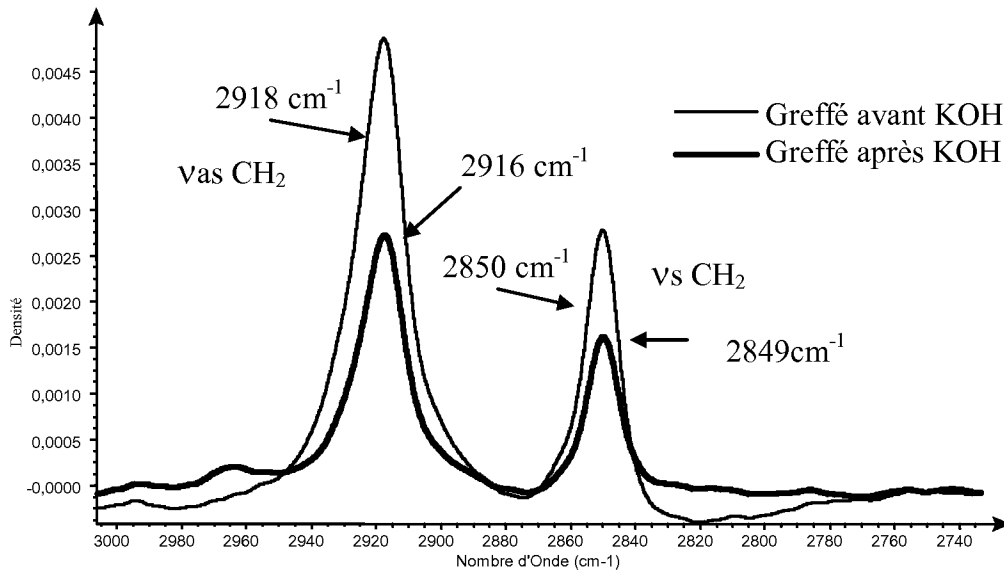
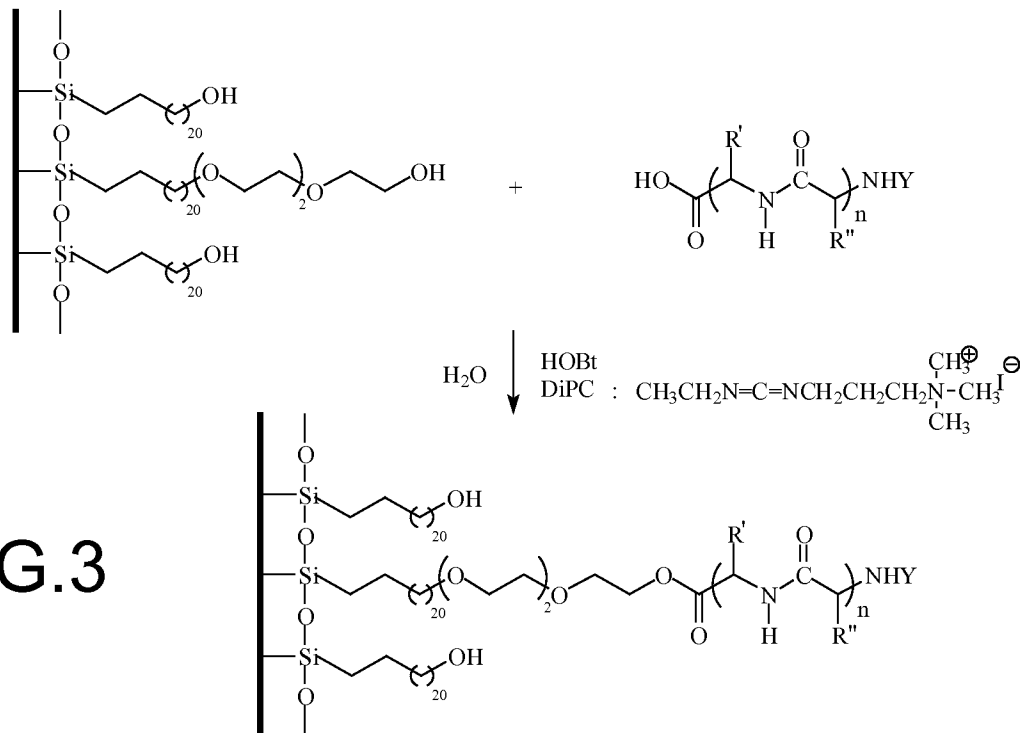


FIG.3



R et R' représentent les chaînes latérales des acides aminés composant le peptide  
 HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole  
 DiPC : Iodure de [3-(N-éthylcarbodiimide)-N-propyl]triméthylammonium  
 Y : H ou groupement Boc (Groupement Butoxycarbonyl)

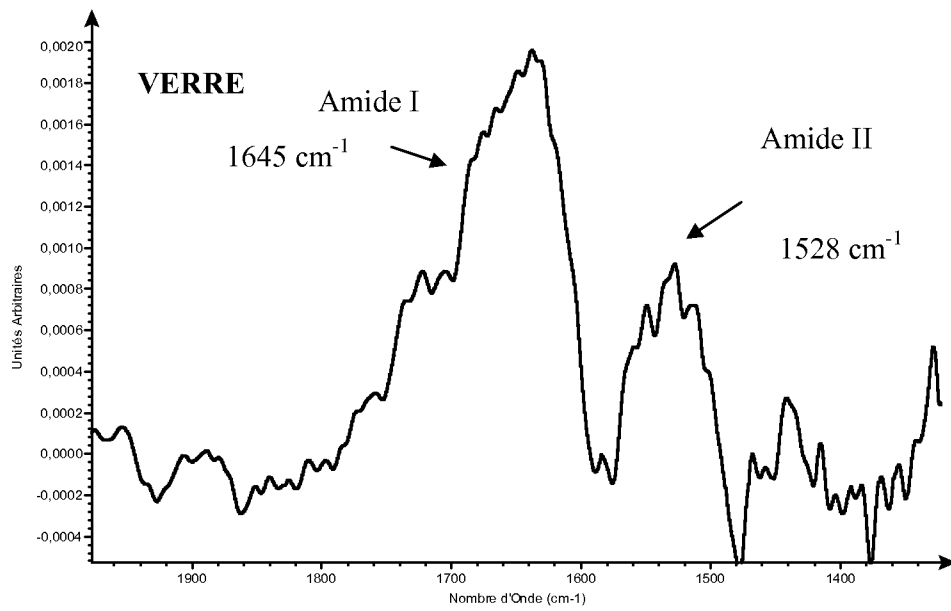


FIG.4

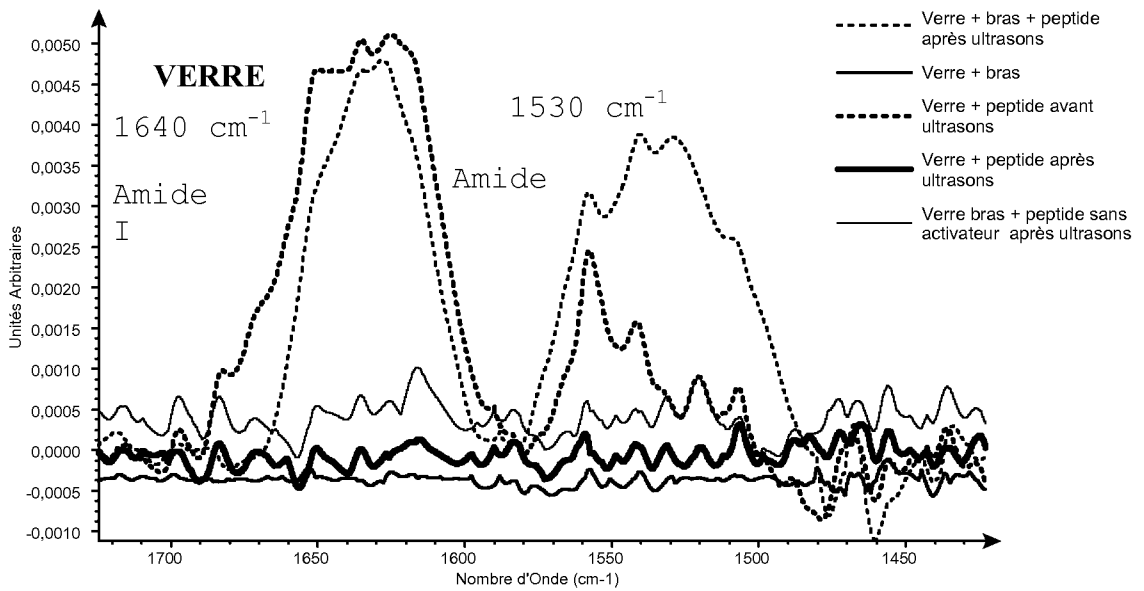


FIG.5

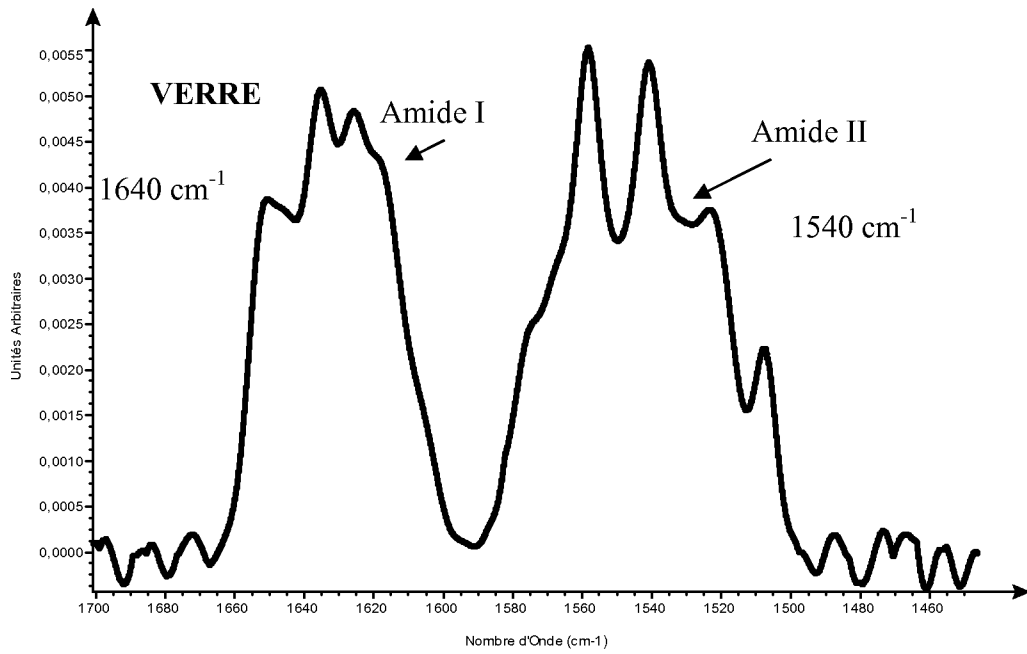


FIG.6

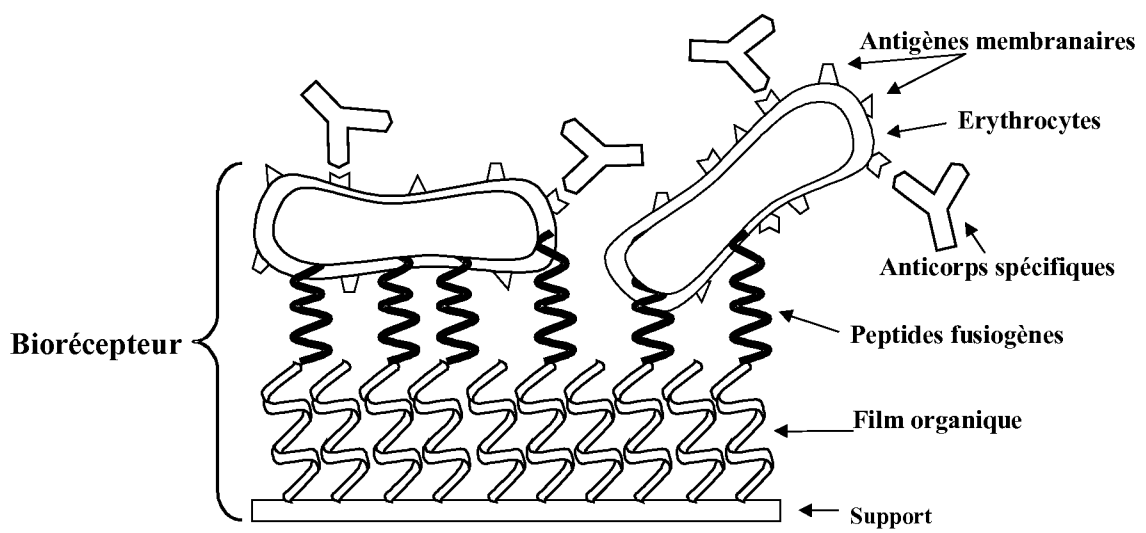


FIG.8

5 / 7

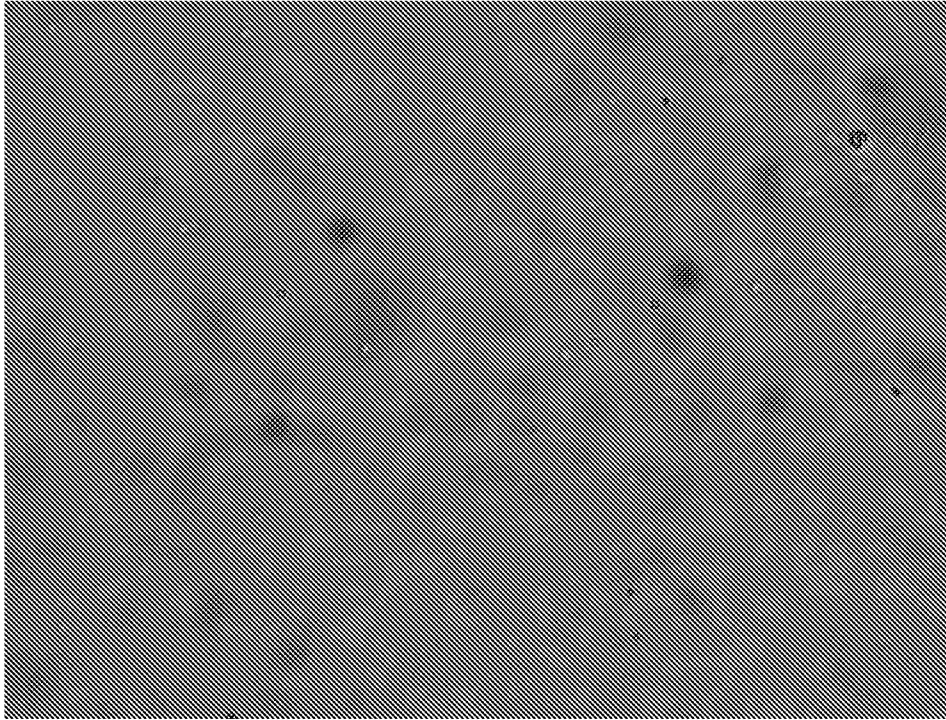


FIG.7A

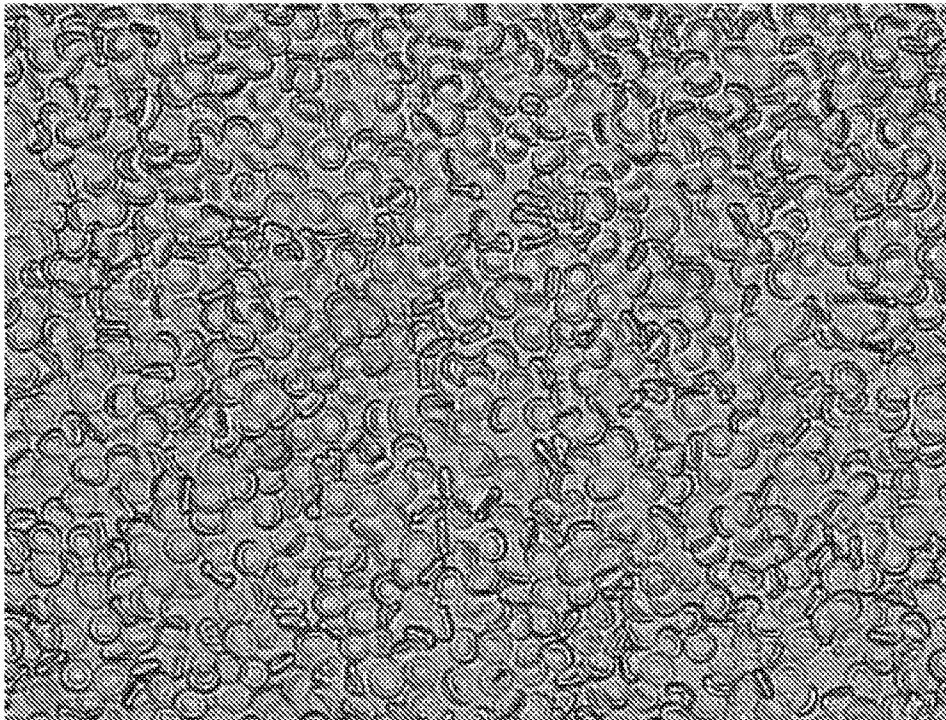


FIG.7B

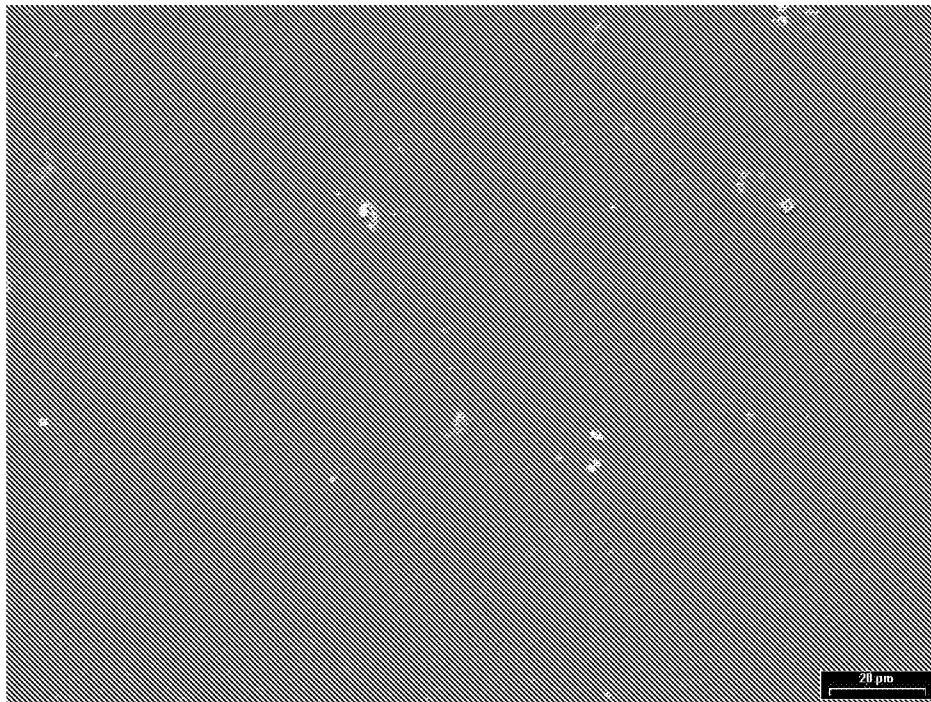


FIG.9A

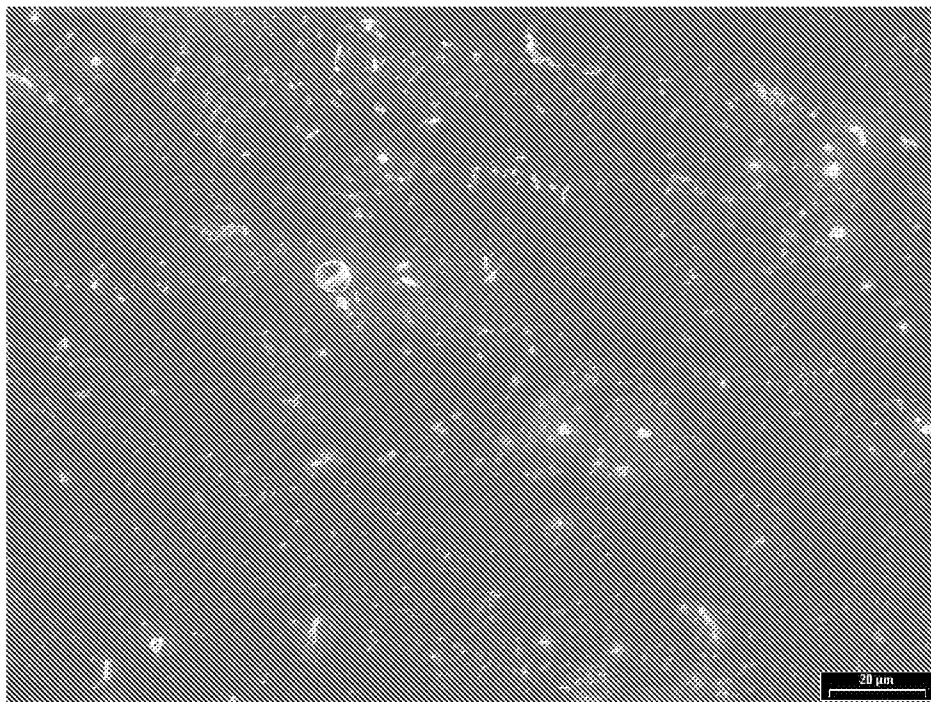


FIG.9B

7 / 7

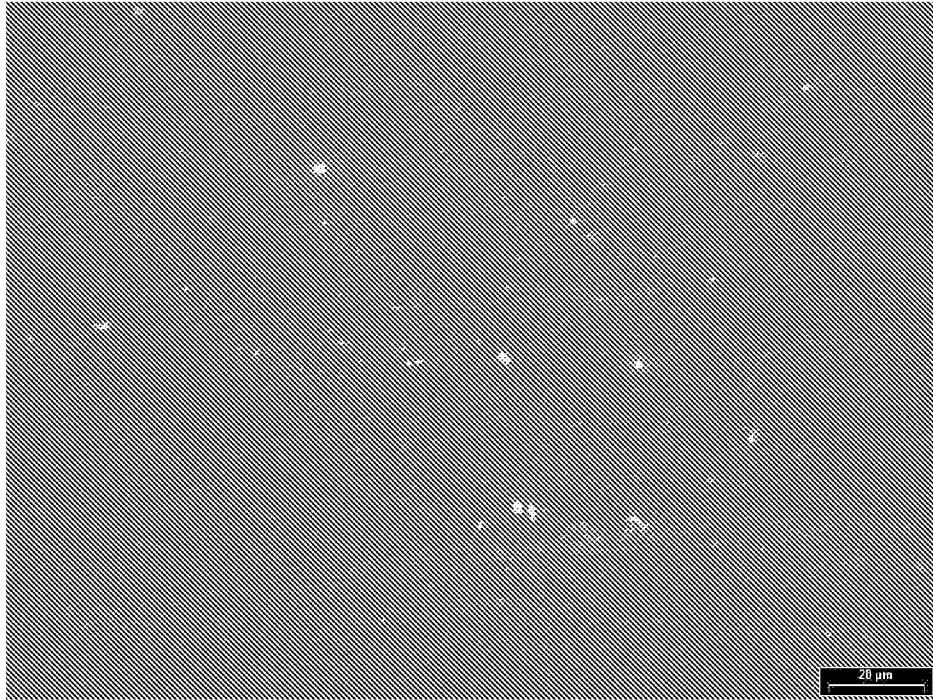


FIG.9C

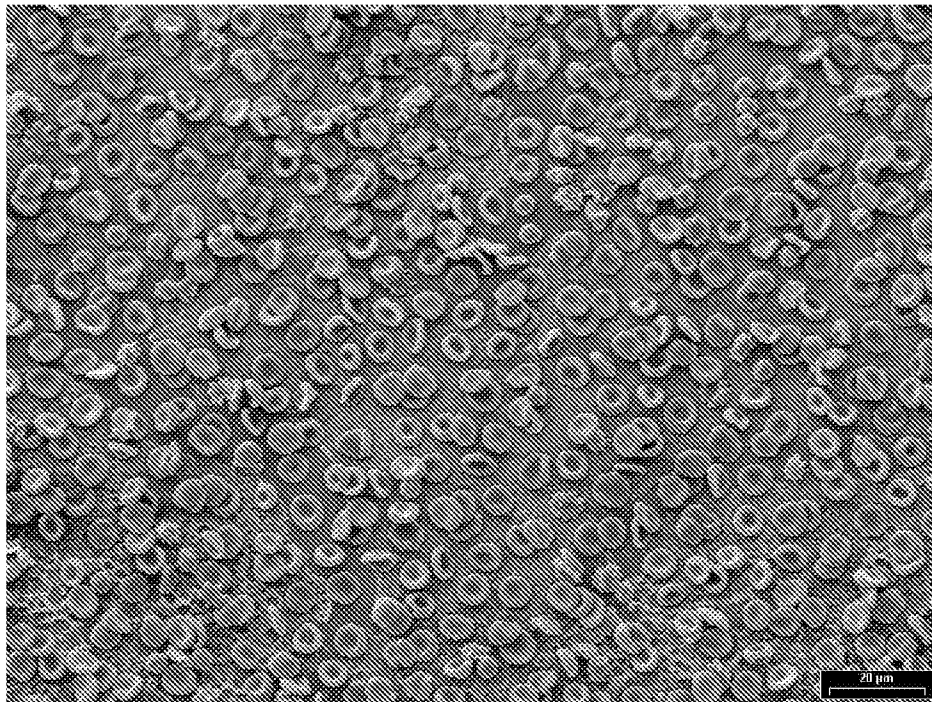


FIG.9D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/054442

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N11/14 C12N11/08 G01N33/531

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/53523 A (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; BENNETAU BERNARD [FR]; BOUSBAA JAMAL [FR]) 26 July 2001 (2001-07-26) the whole document	1-25
Y	WANG ET AL: "Immobilization and hybridization of oligonucleotides on maleimido-terminated self-assembled monolayers" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 344, no. 2, 15 September 2005 (2005-09-15), pages 216-223, XP005013975 ISSN: 0003-2697 the whole document	1-25

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 septembre 2008

Date of mailing of the international search report

16/09/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ury, Alain

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/054442

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTIN PASCAL ET AL: "Liquid mechanical behavior of mixed monolayers of amino and alkyl silanes by atomic force microscopy." LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 19 JUL 2005, vol. 21, no. 15, 19 July 2005 (2005-07-19), pages 6934-6943, XP002459780 ISSN: 0743-7463 the whole document	1-25
Y	----- WO 99/07728 A (SYNT EM S A [FR]; CALAS BERNARD [FR]; GRASSY GERARD [FR]; CHAVANIEU AL) 18 February 1999 (1999-02-18) the whole document	1-25
A	----- EP 1 489 167 A (NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN [JP]) 22 December 2004 (2004-12-22) -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/054442

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153523	A	26-07-2001	AT 292192 T	15-04-2005
			AU 3553001 A	31-07-2001
			CA 2397606 A1	26-07-2001
			DE 60109739 D1	04-05-2005
			DE 60109739 T2	23-02-2006
			EP 1248859 A1	16-10-2002
			ES 2240413 T3	16-10-2005
			FR 2804129 A1	27-07-2001
			JP 2003520350 T	02-07-2003
			US 2003138796 A1	24-07-2003
WO 9907728	A	18-02-1999	AU 754617 B2	21-11-2002
			AU 8988998 A	01-03-1999
			CA 2298932 A1	18-02-1999
			EP 1003771 A1	31-05-2000
			FR 2767323 A1	19-02-1999
			JP 2001512739 T	28-08-2001
EP 1489167	A	22-12-2004	AU 2003220856 A1	16-09-2003
			WO 03074691 A1	12-09-2003
			US 2005106721 A1	19-05-2005

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2008/054442

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

INV. C12N11/14 C12N11/08 G01N33/531

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12N G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 01/53523 A (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; BENNETAU BERNARD [FR]; BOUSBAA JAMAL [FR]) 26 juillet 2001 (2001-07-26) le document en entier	1-25
Y	WANG ET AL: "Immobilization and hybridization of oligonucleotides on maleimido-terminated self-assembled monolayers" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 344, no. 2, 15 septembre 2005 (2005-09-15), pages 216-223, XP005013975 ISSN: 0003-2697 le document en entier	1-25

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&amp;\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 septembre 2008

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/09/2008

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ury, Alain

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>MARTIN PASCAL ET AL: "Liquid mechanical behavior of mixed monolayers of amino and alkyl silanes by atomic force microscopy."                      LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 19 JUL 2005,                      vol. 21, no. 15,                      19 juillet 2005 (2005-07-19), pages                      6934-6943, XP002459780                      ISSN: 0743-7463                      Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25
Y	<p>WO 99/07728 A (SYNT EM S A [FR]; CALAS BERNARD [FR]; GRASSY GERARD [FR]; CHAVANIEU AL) 18 février 1999 (1999-02-18)                      Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25
A	<p>EP 1 489 167 A (NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN [JP]) 22 décembre 2004 (2004-12-22)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2008/054442

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0153523	A	26-07-2001	AT 292192 T	15-04-2005
			AU 3553001 A	31-07-2001
			CA 2397606 A1	26-07-2001
			DE 60109739 D1	04-05-2005
			DE 60109739 T2	23-02-2006
			EP 1248859 A1	16-10-2002
			ES 2240413 T3	16-10-2005
			FR 2804129 A1	27-07-2001
			JP 2003520350 T	02-07-2003
			US 2003138796 A1	24-07-2003
WO 9907728	A	18-02-1999	AU 754617 B2	21-11-2002
			AU 8988998 A	01-03-1999
			CA 2298932 A1	18-02-1999
			EP 1003771 A1	31-05-2000
			FR 2767323 A1	19-02-1999
			JP 2001512739 T	28-08-2001
EP 1489167	A	22-12-2004	AU 2003220856 A1	16-09-2003
			WO 03074691 A1	12-09-2003
			US 2005106721 A1	19-05-2005