

Brevet N° **86337** GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
 du 4 mars 1986
 Titre délivré : **11 NOV. 1987**



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

L'UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN, Halles Universitaires, Place de (1)
L'Université 1, B - 1348 Louvain la Neuve, Belgique
représentée par E.Meyers & E.T.Freylinger, Ing.conseils en propr.ind., (2)
46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires
 dépose(nt) ce quatre mars mil neuf cent quatre vingt six (3)
 à 15⁰⁰ heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :
 1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
Réceptifs de cultures cellulaires eucaryotes et procédé de revêtement de (4)
surface plastique par vaporisation métallique, en vue de la réalisation
de cultures cellulaires eucaryotes in vitro
 2. la délégation de pouvoir, datée de _____ le _____
 3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;
 4. _____ planches de dessin, en deux exemplaires;
 5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
 le vingt-huit février mil neuf cent quatre vingt six
 déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
1. Nadine GUNSBORG, rue Inchebroux 1A, B - 5890 Chaumont-Gistoux (5)
2. Dominique MASQUELIER, rue J.-F. De Craen 25, B - 1040 Bruxelles
3. Claude REMACLE, avenue des Clos 22, 1348 Ottignies (Louvain la Neuve)
 revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) _____ déposée(s) en (7) _____
 le _____ (8)
 au nom de _____ (9)
 élit(é lisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg _____
46 rue du Cimetière, Luxembourg (10)
 sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
 annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à dix-huit mois. (11)
Un des mandataires

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

à 15⁰⁰ heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes,
 p. d.

Mémoire descriptif déposé à l'appui
d'une demande de brevet concernant :

Réipients de cultures cellulaires eucaryotes
et procédé de revêtement de surface plastique
par vaporisation métallique, en vue de la réa-
lisation de cultures cellulaires eucaryotes
in vitro

Université Catholique de Louvain
Halles Universitaires
Place de l'Université 1
B - 1348 Louvain la Neuve

RÉCIPIENTS DE CULTURES CELLULAIRES EUCARYOTES ET PROCÉDÉ
DE REVÊTEMENT DE SURFACE PLASTIQUE PAR VAPORISATION
MÉTALLIQUE, EN VUE DE LA RÉALISATION DE CULTURES
CELLULAIRES EUCARYOTES IN VITRO

05 La présente invention vise essentiellement à l'amélioration des propriétés de surfaces habituellement utilisées pour les cultures in vitro de cellules eucaryotes (par opposition aux cultures de cellules procaryotes, telles les bactéries).

10 L'ancrage et la croissance des cellules eucaryotes normales nécessitent un support doté de propriétés particulières, qui ne sont d'ailleurs pas exactement définies. La mouillabilité et les charges négatives du support paraissent des caractéristiques importantes pour
15 le succès de ces cultures. Différents matériaux peuvent se prêter aux cultures de cellules eucaryotes, tels le verre (normal et borosilicate), les plastiques (cellophane, perspex, ... et surtout polystyrène), les plaques métalliques (titane dans des appareillages industriels)
20 (cfr PAUL J., Cell and Tissue Culture, Churchill Livingstone, Edinburgh & New York, 1975; JACOBY W.B. & PASTAN I.H. Eds., Cell culture, In "Methods in Enzymology", vol. 58, Academic Press, New York, 1979).

Avec le développement de la technologie des cultures cellulaires, les supports les plus utilisés actuellement, parce que les plus faciles d'emploi, sont des récipients en polystyrène, pré-stérilisés (par irradiation ou par des vapeurs toxiques) et à usage unique. Pour les cellules eucaryotes dépendantes de l'ancrage,
25 plusieurs fournisseurs proposent des récipients dont la surface est traitée en vue de permettre une croissance "optimale" des cellules.
30

Ces récipients ne donnent cependant pas totalement satisfaction aux utilisateurs et l'invention a pour
35 objet d'apporter une amélioration aux récipients existants étant entendu qu'il convient de maintenir les possibilités d'observation, notamment d'observation au mi-

croscopie, liées à l'utilisation des récipients habituels de culture.

La solution est apportée selon l'invention par le fait que l'on procède au recouvrement par vaporisation d'une couche métallique mince de préférence de titane sur les supports de polystyrène. En effet, le dépôt d'une couche métallique mince respecte la transparence des supports de culture, et l'application des techniques de microscopie.

L'invention porte donc sur un récipient permettant dans de bonnes conditions des cultures cellulaires eucaryotes tout en maintenant la transparence des supports de culture caractérisé en ce que ledit récipient comporte au moins partiellement un revêtement d'une couche métallique mince, de préférence de titane.

Sous un autre aspect, l'invention porte sur un procédé visant à améliorer les supports de cultures cellulaires eucaryotes en maintenant la transparence de ceux-ci caractérisé en ce qu'on y applique une couche métallique par une technique de vaporisation.

Ledit support peut être de nature quelconque compatible avec l'usage envisagé, c'est-à-dire qu'il doit pouvoir être facilement stérilisé, d'un prix raisonnable, facilement thermoformable, et bien entendu transparent. Ce support est de préférence réalisé en polymère qui est constitué essentiellement de polystyrène, le cas échéant avec des quantités mineures qu'un autre co-monomère et les additifs habituels, bien connus dans la technique.

Les différentes analyses qualitatives et quantitatives ont révélé des qualités nettement accrues de ce recouvrement métallique, par rapport au support polystyrène généralement employé. Ces qualités s'appliquent à différents types cellulaires et notamment les cellules ostéogéniques.

Les procédés de métallisation sont en eux-mêmes largement connus et les techniques courantes peuvent

être mises en oeuvre.

À titre d'illustration, l'exemple qui suit décrit une technique ayant donné largement satisfaction.

05

EXEMPLE 1 : EXEMPLE DE MISE EN OEUVRE DU PROCÉDÉ

A. MATÉRIEL UTILISÉ

- # Fil de titane : largeur : 1 mm
 10 épaisseur : 0,2 mm
 longueur : 200 mm
 poids : environ 0,06 g
- # Support de culture : boîtes de petri FALCON, ref. 3001, diamètre 35 mm (Falcon, Div. Becton-Dickinson, 15 P.O. Box 233, Cockeysville, MD 20130, USA).
- # Evaporateur : EDWARDS 306 COATER, muni d'une platine planétaire et d'un filament hélicoïdal de tungstène. (Edwards High Vacuum, Grand Island Blvd., Grand Island, NY 14072, USA).

20

B. TECHNIQUE DE MÉTALLISATION

Les pompes à rotation et à diffusion de l'évaporateur Edwards sont préchauffées. Le fil de titane est replié sur lui-même et introduit dans le filament de 25 tungstène, de telle sorte qu'il ne dépasse pas de la partie hélicoïdale de ce filament. Ce dernier est ensuite remplacé aux bornes de l'électrode adéquate.

Les boîtes de petri sont déposées sur la platine rotative de l'évaporateur, située à une distance de 30 30 cm par rapport à l'électrode. Les cloches sont remplacées sur l'appareil. La pompe rotative est enclenchée pour obtenir un vide primaire de 10^{-1} - 10^{-2} Torr. La pompe à diffusion est ensuite mise en action, ce qui permet l'obtention d'un vide secondaire de 10^{-5} - 10^{-6} Torr. À 35 cette pression, la platine est mise en rotation (l'électrode étant disposée latéralement dans l'enceinte, la rotation des boîtes autour de l'axe central et sur

elles-mêmes permet un dépôt régulier et homogène du titane).

Le circuit de basse tension est connecté. La tension est progressivement augmentée (de 1 à 4, en unités arbitraires de l'appareillage), jusqu'à incandescence du filament, puis très lentement jusqu'à évaporation du titane. Dans le cas du titane, cette évaporation se réalise aux environs de 1550°C.

Les différents circuits sont coupés, l'air admis dans l'enceinte permet l'ouverture de celle-ci et la récupération des boîtes coatées de titane. L'épaisseur de la couche de titane déposée dans ces conditions peut être estimée à environ 15-20 nm, par comparaison avec une mesure réalisée dans un évaporateur BALZERS UNION, muni d'un quartz piézoélectrique.

C. TESTS PHYSIQUES ET BIOLOGIQUES

ANALYSE DU SPECTRE DE DISPERSION DES RAYONS X

Cette analyse fut réalisée dans un microscope électronique à balayage JEOL JSM 35, équipé d'un spectromètre à dispersion de l'énergie des rayons X (KEVEX), permettant l'analyse des éléments d'une surface. La sensibilité descend jusqu'au sodium (n. at. 11). La hauteur des pics du graphe est proportionnelle aux concentrations relatives.

La figure 1 correspond à un fragment de titane avant évaporation (10 KeV, 10.000 coups). On y voit les deux pics caractéristiques du titane.

La figure 2 correspond à un fond de boîte de petri FALCON Vierge (10 KeV, 20.000 coups). Les éléments détectés sont signalés par des flèches. Les pics proéminents à la droite du graphe viennent du support de laiton sur lequel la boîte fut déposée pour l'analyse.

La figure 3 correspond à un fond de boîte de petri FALCON recouvert de titane dans les conditions décrites en 2.2 (10 KeV, 20.000 coups). On détecte nette-

ment la présence des deux pics du titane.

TRANSPARENCE AVANT ET APRÈS RECOUVREMENT DE TITANE

Un des avantages opératoires du procédé consiste
05 à laisser possible l'observation directe des cellules
cultivées au microscope photonique à contraste de pha-
se. La transparence de la préparation doit donc être te-
nue en compte.

La mesure fut réalisée au microspectrophotomètre
10 REICHERT. Les boîtes de culture vierges ont servi à l'é-
talonnage de l'appareil pour une transmittance de 100%.
Les boîtes recouvertes de titane montrent une transmit-
tance de 50 à 70%.

TESTS BIOLOGIQUES

15 -----
La prolifération et l'adhésion des ostéoblastes
et des cellules mésenchymateuses ont été quantifiées sur
les supports plastiques vierges et recouverts de tita-
ne. En outre, les cinétiques de croissance ont été com-
20 parées avec celle obtenue après l'adjonction d'une ma-
trice organique (collagène) sur le polystyrène. S'il ap-
paraît, dans tous les cas, la présence de titane produit
des résultats supérieurs.

Qualitativement, le support polystyrène-titane a
25 été aussi testé comparativement sur un autre modèle de
culture : la néoformation in vitro des îlots de Langer-
hans, et sa supériorité est également apparue.

REVENDEICATIONS

1. Récipient permettant dans de bonnes conditions des cultures cellulaires eucaryotes tout en maintenant la transparence des supports de culture, caractérisé en ce que ledit récipient comporte au moins partiellement un revêtement d'une couche métallique mince.

2. Récipient selon la revendication 1, caractérisé en ce que le revêtement sous forme d'une couche métallique mince est constituée de titane.

3. Récipient selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit support est constitué essentiellement de polystyrène, les cas échéant avec des quantités mineures qu'un autre co-monomère et les additifs habituels, bien connus dans la technique.

4. Procédé permettant d'améliorer les supports de culture cellulaires eucaryotes en maintenant la transparence de ceux-ci, caractérisé en ce qu'on y applique une couche métallique par une technique de vaporisation.