



## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 37111 A1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/00**

(43) Date de publication :  
**29.01.2016**

---

(21) N° Dépôt :  
**37111**

(22) Date de Dépôt :  
**06.06.2014**

(71) Demandeur(s) :  
**UNIVERSITE AL AKHAWAYNE , UNIVERSITE AL AKHAWAYN B.P 104 AVENUE  
HASSAN II 5300 IFRANE (MA)**

(72) Inventeur(s) :  
**SENDIDE KHALID , ANISSI JAOUAD , EL HASSOUNI MOHAMMED ;**

---

(54) Titre : **Purification d'Acides Nucléiques par une nouvelle méthode basée sur la monétite**

(57) Abrégé : Un processus est développé pour l'isolement et/ou la purification des acides nucléiques à partir de tissus végétaux, comprenant l'utilisation d'un type de phosphate de calcium appelé monétite comme support chromatographique est présenté. Les procédés de l'invention permettent la séparation des polysaccharides, composés phénoliques, acides humiques et protéines, des acides nucléiques. Le procédé comprend : (a) la préparation d'un extrait riche en acides nucléiques et, (b) l'utilisation du support de monétite synthétisé pour la purification des acides nucléiques. Par conséquent, fournir des préparations pures pour les manipulations de biologie moléculaire en aval.

## Abrégé :

Un processus est développé pour l'isolement et/ou la purification des acides nucléiques à partir de tissus végétaux, comprenant l'utilisation d'un type de phosphate de calcium appelé monetite comme support chromatographique est présenté. Les procédés de l'invention permettent la séparation des polysaccharides, composés phénoliques, acides humiques et protéines, des acides nucléiques. Le procédé comprend : (a) la préparation d'un extrait riche en acides nucléiques et, (b) l'utilisation du support de monetite synthétisé pour la purification des acides nucléiques. Par conséquent, fournir des préparations pures pour les manipulations de biologie moléculaire en aval.

*June 6/0*

## 1    DOMAINE DE L'INVENTION

29 JAN 2016

2    La présente invention concerne la préparation d'acides nucléiques avec un degré de pureté élevé, de  
3    toute source contenant des acides nucléiques, notamment à partir de plantes. L'invention concerne  
4    également un procédé de séparation chromatographique, sur un support de phosphate de calcium  
5    type monérite, des acides nucléiques du reste de contaminants. Plus précisément, elle concerne un  
6    procédé de préparation d'acides nucléiques hautement purifiés.

## 7    ART ANTERIEUR

8    La préparation d'acides nucléiques à partir des sources naturelles, incluant la matière végétale est e  
9    fréquemment appliquée dans le domaine du génie génétique et du génie métabolique. L'extraction et  
10    la purification des acides nucléiques à partir des plantes médicinales reste dans l'ensemble  
11    problématiques vue la présence de grandes quantités de contaminants comme les polysaccharides et  
12    les composés phénoliques, connus comme étant des inhibiteurs des enzymes utilisées en biologie  
13    moléculaire expérimentale, et aussi car ils sont connus pour leur effet néfaste sur les acides  
14    nucléiques [John, ME , Nucleic Acids Res . (20) : 2381 (1992)].

15    À cet égard, plusieurs méthodes d'extraction et de purification d'acides nucléiques à partir de plantes  
16    ont été développées. Les méthodes populaires d'extraction comportent l'utilisation de solution de  
17    lyse contenant de polyvinylpolypyrrolidone des(PVPP) ou PVP [ Kim et al, Nucleic Acids Res,  
18    (25):1085-1086 (1997).] ; le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB); [Murray et al,  
19    Nucleic Acids Res (19):4321-4325, (1980).]; l'addition du sérum albumine bovine ( bovine serum  
20    albumine, BSA ) [ Poussier et al., J. Microbiol. Méthodes 51:349-359 (2002)]; échange d'ions [Tas et  
21    al., Appl. Environ. Microbiol. (61) :1822-1827 (1995)]; centrifugation sur support de Sephadex <sup>TM</sup>  
22    [Flemming et al., Appl. Environ. Microbiol. (60):1606-1613 (1994)] et la chromatographie  
23    d'exclusion de taille (Hurt et al. 2001). Une partie des contaminants organiques est séparée des acides  
24    nucléiques avec l'augmentation des forces ioniques par des sels comme l'acétate d'ammonium ou

25 l'acétate de potassium [Lee et al., Appl. Environ. Microbiol, 62:3787, (1996); Ogram et al., J.  
26 Microbiol . Methods, (7) : 57, (1987)]. En outre, US. Pat. 2008 / 0293931 A1 décrit un procédé pour  
27 la purification de l'Acides nucléiques, mais qui utilise des composés chimiques très toxiques.  
28 Cependant, ces approches ne permettent pas l'élimination totale des contaminants organiques, à  
29 l'exception des méthodes électrophorétiques sur gel d'agarose ou de polyacrylamide suivie par  
30 l'excision et l'extraction ou l'électrodialyse des acides nucléiques, qui reste la seule technique pour  
31 l'élimination complète des contaminants organiques [Ausubel et al., (eds.), Current Protocols in  
32 Molecular Biology, Jhon Wiley & Sons, Inc. , New York, NY (1995 )]. Le rendement de ces  
33 methods reste toutefois résuit et demande beaucoup de temps [Ma et al., protection des cultures  
34 (26):145-161 (2007)] .

35 En général, les procédés connus pour la préparation des acides nucléiques de haute pureté emploient  
36 de grandes quantités de solvants organiques et de composés toxiques (par exemple, le chloroforme,  
37 et phénol), sont souvent combinés à d'autres techniques comme l'ultracentrifugation dans un  
38 gradient de Chlorure de Césium CsCl [Leff et al., Appl. Environ. Microbiol, (61):1141-1143 (1995)]  
39 ou des membranes à base de silice. Ces procédés restent appropriés pour la préparation de petites  
40 quantités d'acides nucléiques purs, demeurent couteuses pour la production de grandes quantités  
41 d'acides nucléiques hautement purifiés.

42 Bien qu'il existe plusieurs méthodes rapportées pour l'isolement d'acides nucléiques et de leur  
43 purification, peu de procédés combinent rendement, pureté, temps et coûts réduits et absence de  
44 produits chimiques toxiques

45 En outre, des kits pour la purification d'acides nucléiques à partir de plantes et d'autres organismes  
46 sont disponibles. Actuellement, les kits commercialisés permettent une préparation pure d'ADN à  
47 partir de plantes et d'autres organismes. La majorité de ces kits contient du chlorhydrate de  
48 guanidine connu comme très réactif et dangereux. En plus, ces kits sont relativement chers.  
49 Cependant, certaines plantes riches en polysaccharides et les composés phénoliques (plantes

50 principalement tannées et visqueux) dépassent la capacité du kit à purifier les acides nucléiques.  
51 D'autres kits commerciaux comprennent QuickExtract™ de EPICENTRE Biotechnologies,  
52 MasterPure™ permettent la purification des acides nucléiques à partir des plantes [US Brevet  
53 6,270,962], PureLink® kit de purification d'ADN génomique à partir des plantes d'Invitrogen® ,  
54 PowerPlant® Pro Kit d'isolement d'ADN , GeneJET™ usine de purification de l'ADN génomique  
55 Mini Kit et ainsi de suite. La plupart de ces kits sont coûteux et avec une faible capacité de lier les  
56 acides nucléiques, ne dépassant en général pas le mg.

57 Les supports chromatographiques du phosphate de calcium largement utilisés par les  
58 biotechnologistes souvent accompagnés de perte élevée d'acides nucléiques. L'utilisation du  
59 phosphate de calcium comme support chromatographique a ses avantages relatifs aux propriétés  
60 physico-chimiques de la matrice, comme sa sélectivité unique, la séparation moléculaire nette  
61 dépendant du poids moléculaire, ou la densité de charge ; sa grande capacité de lier de grandes  
62 quantités d'acides nucléiques. En plus, les matrices du phosphate de calcium présentent une faible  
63 spécificité envers les substances hydrophobes et une faible adsorption de composés organiques de  
64 différents poids moléculaire. En outre, le calcium est connu pour supporter une large gamme de  
65 conditions physico-chimiques, par sa stabilité thermique (comme la température et la pression), et  
66 par sa tolérance au pH (pH > 5.5), qui permettent une optimisation des conditions de séparations  
67 pour une bonne fixation des acides nucléiques.

68 La chromatographie sur une colonne de phosphate de calcium est typique. Elle ne peut être  
69 considérée ni comme une chromatographie d'affinité, ni comme une chromatographie d'échange  
70 d'ions. Elle fonctionne selon les deux modes ; l'échange d'ions en raison de son inclusion de  
71 fragments positivement et négativement chargés et l'affinité, où les acides nucléiques se lient à la  
72 matrice, en vertu d'interactions entre les groupes phosphate des acides nucléiques et les résidus  
73 calcium du support. Ainsi, elle pourrait être définie comme une chromatographie de pseudo affinité  
74 et de chromatographie pseudo- échangeuse d'ions. Après lavage du support, les acides nucléiques

75 peuvent être élués par un gradient de force ionique des tampons phosphates. De cette manière, sans  
76 engagement des composés organiques contaminants et toxiques.

77 A cet égard, l'hydroxyapatite, un type de support de calcium de phosphate, a été déjà décrit pour la  
78 purification d'acides nucléiques de différentes topologies, tels que des plasmides [US. Pat, 6730781  
79 B1. ; US. Pat, 5843731.; US. Pat, 6406892 B1. ; US. Pat, 5707812]. ; et ADN simple brin de  
80 bactériophages [US. Pat., 4833239].

81 Les inventeurs de la présente invention fournissent un procédé de purification des acides nucléiques,  
82 à grande échelle, basé sur un type de calcium-phosphate appelé monetite. Ils ont observé que le  
83 contrôle de la forme et de la taille des cristaux de monetite peut se faire par l'application de l'énergie  
84 ultrason.

#### 85 RESUME DE L'INVENTION

86 Les manipulations expérimentales utilisées en ingénierie métabolique et génétique, telles que la PCR,  
87 RT-PCR, et les digestions enzymatiques de l'ADN sont essentielles pour la recherche et le  
88 développement dans le domaine des sciences de la vie et de la biotechnologie. il est préférable de  
89 préparer de grandes quantités d'acides nucléiques à partir de différentes sources, avec une pureté  
90 élevée, un temps de préparation court et e à coût réduit..

91 Un aspect de la présente invention est d'établir un procédé pour la purification d'acides nucléiques à  
92 partir de tissus végétaux, qui comprend, (1) la récolte et le broyage du matériel végétal dans des  
93 conditions appropriées, (2) une l'étape de lyse cellulaire, (3) une étape de préparation d'extrait riches  
94 en acides nucléiques, (4) une étape de chargement et de lavage d'acides nucléiques sur un support  
95 constitué de monetite, (5) l'élution des acides nucléiques, et (6) une étape de filtration sur gel pour  
96 dessaler des acides nucléiques. Consécutivement, pour atteindre l'objet mentionné ci-dessus, un  
97 mode de réalisation de la présente invention est relatif à la préparation d'un support solide du  
98 phosphate de calcium type monetite basé sur un traitement par ultrasons.

 4

99 Certaines méthodes reconnues pour la préparation des acides nucléiques à partir de différentes  
100 sources comprennent le PVP/CTAB et la guanidine ou des tampons de cyanate [Nelson et al.,  
101 Biochem Anal., (207):197-201 (1992)] combinés à l'effet d'un détergent ionique tel que le SDS  
102 (dodécylsulfate de phosphate de sodium), ou similaires, sont couramment utilisés pour éliminer, en  
103 amont, les contaminants organiques. Le polyvinylpyrrolidone (PVP) par exemple est connu pour sa  
104 liaison, au cours de la première étape de la lyse à des groupes spécifiques de molécules organiques,  
105 tels que des composés phénoliques, de composés et également par trans-protecteur des acides  
106 nucléiques des oxydations induites par ces composés. Les purifications en aval comprennent  
107 généralement une extraction au phénol/chloroforme, parfois suivie d'une électrophorèse sur gel  
108 d'agarose [Vogelstein et al., Proc. Nat. Acad. Sci, (76):615-619 (1979)], ou colonne de  
109 centrifugation à membrane de silice. La plupart des composés inclus dans ces procédés sont connus  
110 pour être toxiques pour l'Homme, et pour l'environnement.

111 La présente invention décrit un nouveau procédé simple et particulièrement efficace pour la  
112 purification d'acides nucléiques à partir de n'importe quelle origine végétale ou autres sources  
113 contenant des acides nucléiques à concentrations adéquates. Le procédé de la présente invention se  
114 rapporte à un procédé qui implique : (a) un mélange de lyse tamponnée , un sel minéral avec  
115 concentration optimisée pour l'efficacité de précipitation ultérieure des acides nucléiques, un agent  
116 chélateur des composés phénoliques tels que ceux appartenant à la série de PVP (PVP K10 , PVP  
117 K30 etc), d'un agent chélateur choisi parmi les chélateurs communs et un détergent cationique , (b) la  
118 séparation des acides nucléiques des débris du tissu de plante , (c) la récupération des acides  
119 nucléiques extraits à l'aide d'une précipitation conventionnelle, (d) la purification par une  
120 chromatographie sur support à base de monetite, et (e) élimination des sels à partir des acides  
121 nucléiques contenant des fractions par filtrations sur gel .

122 la présente application concerne de ce fait un procédé de production d'un type de calcium phosphate  
123 appelé monetite ayant des propriétés cristallographique spécifiques ; et de diamètre moyen: 26 nm à

/ / / / /

124 57 nm, déduit du diagramme de diffraction des rayons X selon l'équation de Scherrer à la FWHM  
125 corrigée dans l'intervalle de 26 nm et 57 nm pour CPTM soniqué et non soniquée aux ultrasons,  
126 respectivement. Ce support permet une séparation en une étape des acides nucléiques des protéines,  
127 des polysaccharides, des composés phénoliques et alcaloïdes.

128 Le phosphate de calcium décrit dans la présente invention permet une liaison efficace d'acides  
129 nucléiques permettant un nettoyage rapide des acides nucléiques, par conséquent, permet une élution  
130 subséquente des acides nucléiques dans des états purs.

131 Le présent procédé est avantageux par rapport aux procédés de l'art antérieur pour la préparation de  
132 l'ADN génomique de grande pureté étant donné que les procédés décrits dans le document ne  
133 s'adaptent pas pour de grandes quantités d'ADN. En outre, les méthodes présentées dans la présente  
134 invention ne comprennent pas l'utilisation de solvants toxiques ou produits chimiques coûteux tels  
135 que le chloroforme, le phénol et le CTAB.

#### 136 BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

137 Fig. 1 (A): schéma général du procédé de l'extraction totale des acides nucléiques et la purification à  
138 partir de sources végétales selon la présente invention. (B): schéma général du procédé de (A') :  
139 l'extraction des ARN totaux et la purification à partir de sources végétales selon la présente  
140 invention, (B') : l'extraction et la purification de l'ADN totale d'origine végétale selon la présente  
141 invention

142 Fig. 2 : diffractogramme à rayons X de l'échantillon CMPT-S, montrant la présence de tous les plans  
143 de Sherrer correspondants.

144 Fig. 3 comparaison des spectres IR-TF des échantillons, soniqué (CPTM -S) : (A) et non soniqué  
145 CPTM -NS : (B).

146 Fig. 4 analyse EUDAX de micro-élément et la microscopie électronique à transmission de CPTM-S  
147 et CPTM-NS.



148 Fig. 5 (A) : Capacité de fixer l'ADN génomique extrait d'*E. coli* par les deux supports : CPTM-NS et  
149 CPTM-S. Le débit a été ajusté à 0.2 ml/min. Les conditions de chargement sont ; l'ADN à 35 mg/1  
150 ml de tris-Cl (100 mM) à différent pH, le débit ; 0.5 ml/min, l'élution selon un gradient de phosphate  
151 de potassium (50 mM à 400 mM) à pH indiqué. l'étape de lavage est effectuée avec le même tampon  
152 (100 mM Tris- Cl) . (B) : Variation de la capacité de liaison de l'ADN d' *E. coli* des deux  
153 préparations de CMPT et en fonction du débit de l'élution.

154 Fig. 6 : résultats obtenus avec test de Folin-Ciocalteux et de Lugol. La solution d'acides nucléique  
155 obtenue après précipitation à l'isopropanol a été dissoute dans un tampon TE 500 µl.

156 Fig. 7 image de l'électrophorèse sur gel d'agarose montrant des préparations typiques de l'ADN  
157 génomique (bande D), et d'autres profils RAPD obtenus en utilisant l'ADN génomique préparé selon  
158 le procédé de la présente demande à partir de différentes plantes.

#### 159 MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

160 Le procédé décrit dans la présente invention répond à un besoin dans le domaine de la recherche en  
161 génie métabolique en fournissant un procédé simple et efficace pour l'isolement et la purification des  
162 acides nucléiques comprenant les ADN et les ARN (Fig. 1).

163 Tout au long de la présente demande, plusieurs brevets et publications sont désignés par une citation  
164 d'identification pour décrire l'état de l'art auquel la présente invention se rapporte. Tel qu'utilisé ici,  
165 certains termes seront utilisés selon les définitions attribuées. Les acides nucléiques extraits et  
166 purifiés dans la présente invention comprennent des ADN génomiques et/ou mitochondrial,  
167 provenant de plantes ou plastidiales. En outre, la présente invention s'étend à la purification des  
168 ARN. L'ADN génomique peut être obtenu à partir de feuilles de plantes, de fruits, tige de la plante  
169 ou de la culture cellulaire. La récolte et le transport de la préparation des tissus de la plante peuvent  
170 être réalisés selon des procédés connus, y compris la récolte de jeune tissu végétal et de broyage en

Line C.I. 7

171 utilisant des procédés classiques tels que le mortier et le pilon, combinés ou non à l'azote liquide. Par  
172 conséquent, la meilleure méthode consiste à congeler les échantillons sur glace sèche *in situ*.  
173 Afin d'augmenter efficacement le rendement des acides nucléiques à partir de tissus de la plante, il  
174 est préférable au cours de l'étape de broyage des tissus de préparer les des tissus de petites tailles, de  
175 préférence entre 35 mesh à 10 mesh. La lyse des tissus de la plante est effectuée par mise en  
176 suspension des tissus végétal dans un milieu de lyse tamponnée contenant ; Tris-(hydroxyméthyl)  
177 aminométhane-HCl à des concentrations allant de 10 mM à 200 mM, de préférence, entre 80 mM et  
178 120 mM. Le milieu de lyse décrit dans la présente invention comprend d'autres composés chimiques  
179 qui contribuent à l'efficacité de la lyse cellulaire et maintenir une bonne qualité d'acides nucléiques.  
180 La composition, inclu une concentration optimale en sel ; par exemple le chlorure de sodium à des  
181 concentrations supérieures à la concentration qui induit la précipitation des acides nucléiques, de  
182 préférence entre 0.1 M et 3 M, de préférence, entre 1.5 M et 2 M. La présence d'un agent tensioactif  
183 cationique ou anionique est nécessaire à la solubilisation des membranes cellulaires. Un exemple  
184 bien connu comprend le dodécyl sulfate de sodium à des concentrations allant de 1% à 2.5% (p/v),  
185 de préférence à 2% (p/v). En outre, dans la présente invention, 10 mM à 50 mM, de préférence  
186 d'environ 20 mM à 50 mM d'un chélateur bivalent, précisément le sel de l'EDTA est présent dans la  
187 solution de lyse. En outre, il est préférable que le pH du milieu de lyse soit ajusté dans une marge  
188 d'environ 6.8 à 8.. En variante, l'addition à la fois de CTAB et de la PVP dans le milieu de lyse est  
189 bien connue pour contribuer à la précipitation rapide des polysaccharides et des composés  
190 phénoliques, respectivement, à partir de l'extrait aqueux. Dans un mode de réalisation préféré de la  
191 présente invention, en omettant, ces deux produits chimiques, il n'y a pas eu d'altération de la qualité  
192 et la quantité des acides nucléiques à préparer, étant donné que le processus en aval utilisé dans cette  
193 application sera efficacement utile pour éliminer les polysaccharides et les autres molécules  
194 organiques de l'extrait riche en acides nucléiques. Cependant, il est préférable de maintenir une  
195 certaine concentration de PVP au cours de l'extraction.

196 Les acides nucléiques à partir de lysat clarifié ont été précipités avec un alcool, de préférence par le  
197 2-propanol ou l'éthanol, suivies de la dissolution du précipité riche en acides nucléiques dans un  
198 tampon phosphate 5 mM, pH 7.0. Il est préférable d'utiliser un tampon phosphate de potassium à la  
199 place d'un tampon de phosphate de sodium en raison de sa grande allocation pour les acides  
200 nucléiques ADN, principalement pour se lier à la matrice de monetite. Le tampon, Tris-HCl est  
201 également approprié pour la dissolution de extrait riche en acides nucléiques.

## 202 Exemple I

### 203 Synthèse de CPTM

204 Une suspension aqueuse de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a été agité énergiquement à une température de  $100^\circ\text{C}$ . Des  
205 quantités appropriées de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ont été ajoutés, goutte à goutte, à un débit de 0.5 ml/min, afin de  
206 préparer le phosphate de calcium avec le rapport Ca/P d'environ 1. Le pH du milieu réactionnel a été  
207 laissé varier comme l'addition de l'acide phosphorique procède, sans ajustement. Après que le  
208 mélange réactionnel atteint le rapport stœchiométrique Ca/P désiré, d'environ 1, il a été soumis à des  
209 énergies ultrasons à fréquence fixe de 20 kHz et une puissance de sortie de 250 W à la température  
210 de la réaction.

## 211 EXEMPLE II

### 212 Caractérisation spectroscopique :

213 Les spectres de la diffraction des rayons X (DRX) des échantillons en poudre préparés dans des  
214 conditions optimales, (environ 150 mg dans un support en aluminium), ont été obtenus dans la  
215 gamme de  $10^\circ$  ( $2\theta$ ) de  $70^\circ$  ( $2\theta$ ) avec un X'Pert PRO MRD XL diffractomètre, fonctionnant à 40 kV  
216 et 30mA, à rayonnement de graphite-CuK $\alpha$  monochromatique de longueur d'onde  $\lambda = 0,1540598$  nm,  
217 et à une vitesse de balayage de  $0.030^\circ$   $2\theta/\text{min}$ . Les intensités relatives ont été déterminées en tant que  
218 sommets de la ligne de diffraction par rapport au signal le plus intense normalisé à l'intensité de 100.  
219 les nombres de Bragg ont été choisis pour estimer la taille des cristallites et la déformation du réseau.

220 On a estimé la taille cristalline des particules de la poudre sur la base de l'équation de Debye-  
221 Scherrer. ainsi, la taille cristalline a été estimée base de l'intrigue classique W-H (Williamson-Hall).  
222 Les constantes de réseau de l'unité ont été déterminées par la technique de diffraction des rayons X  
223 en utilisant le logiciel X Powder v2010.01.30 Pro. Les profils de diffraction des rayons X de la  
224 CPTM soniqué ne montrent pas la présence d'impuretés. Les groupes fonctionnels présents dans le  
225 monetite soniqué et non soniqués ont été établis spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier  
226 (IR-FT, Perkin Elmer Spectrum One, USA) dans la région  $450-4000\text{ cm}^{-1}$ , pour les échantillons de  
227 poudre de 1 mg en mélange avec le KBr (Merck). Spectres ont été enregistrés à  $4\text{ cm}^{-1}$  de résolution,  
228 en moyenne 80 scans. La taille et la structure cristalline de la poudre non soumise à une sonication et  
229 de monetite traitées aux ultrasons ont été analysées par microscopie électronique à transmission  
230 (TEM, EUDAX), voir Fig. 4. Quelques gouttes de suspension dans de l'éthanol des échantillons de  
231 poudre ont été déposés sur des grilles de cuivre revêtues de carbones. Diagrammes de diffraction des  
232 électrons ont été obtenus en mode micro-probe. Le spectre XRD de la poudre de phosphate de  
233 calcium monetite, tel que synthétisée (que ce soit ou non traité aux ultrasons), synthétisés selon les  
234 conditions mentionnées ci-dessus, sont présentés à la Fig. 2. Tous les pics liés au motif de diffraction  
235 est parfaitement appariée avec le monetite (carte JCPDS n° 00-009-0080). L'absence d'impuretés et  
236 une augmentation de la cristallinité des nanoparticules de CPTM traités par ultrasons sont également  
237 prouvés par analyse IR-TF. Les paramètres de maille expérimentalement déterminés de CPTM-S et  
238 CPTM synthétisés dans cette étude sont similaires aux des valeurs de la littérature précitées. Les  
239 paramètres de maille obtenus pour la CPTM et CPTM-S sont similaires au monetite triclinique, avec  
240 les valeurs:  $a = 6,910\text{ \AA}$ ,  $b = 6,627\text{ \AA}$ ,  $c = 6,998\text{ \AA}$ ,  $\alpha = 96,34^\circ$ ,  $\beta = 103,82^\circ$  et  $\gamma = 88,33^\circ$ . Les  
241 spectres FTIR deux données à la Fig. 3 sont obtenus à partir d'échantillons CPTM -S et NS - CPTM  
242 préparé en utilisant un rapport molaire Ca / P de 1 à un traitement de sonication et sans traitement par  
243 ultrasons, respectivement. PO étirement a été observé autour de  $1124, 1056$  et  $986\text{ cm}^{-1}$ . Le P -O- H

244 vibrations H -O- H et tous sont absents dans les deux spectres. Les spectres FTIR sur la Fig. 3 (a et  
245 b) ne présente pas de bande d'absorption associées à d'autres molécules inorganiques.

#### 246 Exemple III

247 Préparation d'extrait riches en acides nucléiques:

248 Cinq grammes de feuilles ont été broyées en un macérât fin avec un mortier et un pilon préalablement  
249 refroidie puis transférée dans un flacon de 100 ml Nalgene® contenant 50 ml de tampon d'extraction  
250 préchauffé à 55 ° C. Le mélange a été agité au vortex pendant 1 min et incubé pendant 15 min à  
251 55°C sous agitations occasionnelles. L'homogénat est laissé dans la glace pendant 15 min, puis  
252 centrifugé à 10.000 g à 4°C pendant 10 min. Le surnageant a été transféré dans un tube de 50 ml  
253 centrifugeuse Oak Ridge. Un volume d'isopropanol est ajouté et le mélange est centrifugé pendant  
254 15 minutes à 15.000 g, à 4° C. Le culot obtenu a été lavé avec de l'éthanol à 75% et centrifugé dans  
255 les mêmes conditions que précédemment pendant 5 min. les culots obtenues ont été séchées à 37°C  
256 sous aération pendant 30 minutes, puis remis en solution dans 1 ml d'eau bidistillée ou de l'eau  
257 MilliQ. L'extrait riche en acides nucléiques a été utilisé directement pour les étapes de purification.

#### 258 Exemple IV

259 La détermination et l'évaluation de la capacité de fixation :

260 Dans un premier temps, la suspension de CPTM (100 mg) a été préparée et conditionnée et  
261 équilibrée avec le tampon de potassium à 5 mM sur un spin colonne de polypropylene stérile. La  
262 capacité de liaison des CPTMs a été déterminée sur des petites colonnes de centrifugation contenant  
263 une quantité donnée du phosphate de calcium à laquelle des quantités croissantes d'ADN génomique  
264 dans 5 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7.2), préparé à partir de *E. coli* en utilisant  
265 NucleoBond AXG® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Allemagne), est utilisé comme acide  
266 nucléique de référence. Les solutions mères de l'ADN avec des concentrations allant de 0.01 mg/ml  
267 dans le tampon (C); (Tris- Cl 10 mM, EDTA, 25 mM, pH 6.5).

268 100 µl de chaque concentration sont chargés sur des colonnes de centrifugation et centrifugés dans  
269 une première étape à 1000 g pendant 10 min, suivie par une étape rapide à 4000 g pendant 2 min. Le  
270 perméat a été analysé pour les acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant le  
271 bromure d'ethidium à 0.2 µg/ml en tant que fluochrome. En outre, l'effet du débit de la phase mobile  
272 sur la capacité de fixation a été évalué par variation de la vitesse de l'étape de chargement dans une  
273 colonne PD10 rempli de 3 ml de CPTM. Une concentration donnée de l'ADN génomique pur, purifié à  
274 partir de *E. coli* TG1, solubilisé dans diverses concentrations de Tris- Cl (10 mM à 200 mM) ou des  
275 tampons d'acétate de sodium (10 mM-1000 mM) ou de phosphate de potassium (10 mM-100 mM) et  
276 à différents pH ont été chargés sur la colonne de CPTM 200 mg avec. Différentes quantités d'ADN,  
277 allant de 100 ng à 100 mg, ont été chargés sur une colonne pré-équilibrée de 1 g de phosphate de  
278 calcium type monetite (CPTM-S) préparé dans un tampon phosphate de potassium (30 mM, pH 7.2).  
279 Les conditions de tampon, y compris le type de tampon, de la force ionique, la concentration du  
280 tampon, pH de la solution et le débit de la phase mobile ont été optimisés pour une meilleure  
281 fixation des acides nucléiques sur la CPTM. La capacité de liaison statique dans les tampons utilisés  
282 a été déterminée (Fig. 5).

### 283 Exemple V

#### 284 Purification des acides nucléiques :

285 La poudre de monetite est hydratée avec un tampon de phosphate à 5 mM, et mise dans une colonne.  
286 L'équilibration de la colonne a été accomplie par lavage avec deux volumes de colonne avec le  
287 tampon phosphate de potassium 5 mM. L'extrait brut d'acide nucléique est chargé sur la colonne de  
288 monetite. La colonne a ensuite été lavée avec 3 volumes de tampon de phosphate de sodium à 60  
289 mM à pH 7.2, pour éliminer tous les contaminants y compris les polysaccharides, protéines,  
290 composés phénoliques, etc. L'élution des acides nucléiques est effectuée avec 6 volumes, dans un  
291 gradient de tampon phosphate de potassium à partir de 60 mM à 300 mM. Les fractions (200 µl) sont

292 traitées séparément, et ceux ayant le même profil ont été réunis. La séparation des contaminants est  
293 déterminée par échantillonnage de 20  $\mu$ l de chaque éluât et mis à réagir avec un volume du lugol et  
294 avec le réactif de Folin-Ciocalteux (FC) (voir Fig. 6), selon les protocoles conventionnels de la  
295 technique. Au cours des expériences mentionnées ci-dessus, le pH a été choisi à une valeur de 6.5.  
296 Cependant, beaucoup d'attention a été accordée à évaluer l'effet d'une solution de pH sur la capacité  
297 de liaison.

298 À cet égard, le dosage de la capacité de fixation est effectué à des pH allant de 5.0 à 11.0. Les  
299 résultats montrent que les valeurs de pH optimales pour une bonne capacité de fixation sont de 6.0 à  
300 7.0. le calcium de phosphate type monetite peut fixer l'ADN dans des conditions acides ou neutres,  
301 mais ne le pas en conditions alcalines. Cela est dû à l'augmentation des phosphates à charge négative  
302 au niveau des acides nucléiques en raison de leur protonation au-dessus de leur pKa de  $\sim 6.2$ . En  
303 conséquence, ils deviennent plus rigides et non flexible, ce qui les rend moins accessible au calcium  
304 au niveau du support solide CPTM. A un pH d'environ 7.0, les acides nucléiques sont dans un état de  
305 transition à partir de la la forme ionisé à la forme protonée, ce qui permet une flexibilité accessible  
306 pour une forte fixation au support solide. À pH 8.0, l'ensemble des acides nucléiques semble avoir  
307 atteint un niveau de rigidité, à effet affaiblissant la rétention des acides nucléiques sur CPTM, et  
308 empêche une forte fixation. Des valeurs de pH optimales de 5.5 à 7.5 permettent les acides  
309 nucléiques de se fixer fortement au support solide et, par conséquent, augmente le temps de rétention  
310 au cours d'une élution en gradient avec des tampons phosphate (20 mM à 400 mM ) pour une  
311 meilleure résolution des acides nucléiques.

312 Contrairement au calcium phosphate type hydroxyapatite, la monetite fixe fortement les acides  
313 nucléiques avec une haute capacité de liaison de  $65.784 \pm 0.291$  mg/g par rapport à des valeurs  
314 d'environ 30 mg/ml déterminée par pour d'hydroxyapatite.

*line 6/1*

## Revendications :

1. Utilisation d'un support chromatographique de phosphate de calcium type monetite pour la purification des acides nucléiques.
2. Une méthode dans laquelle un extrait riche en acides nucléiques est préparée à partir des tissus de plantes
3. Une méthode selon les revendications 1 et 2 dans laquelle le support chromatographique est utilisé pour l'élimination des contaminants, incluant polysaccharides, protéines et composés phénoliques à partir de l'extrait riche en acides nucléiques.
4. Une méthode selon les revendications 1 et 2 dans laquelle les acides ribonucléiques sont séparés des acides désoxyribonucléiques.
5. Une méthode selon les revendications 3 et 4 dans laquelle les fractions riches en acides nucléiques sont dessalées par filtration sur gel.

*1/10/6/10*



1  
2  
3

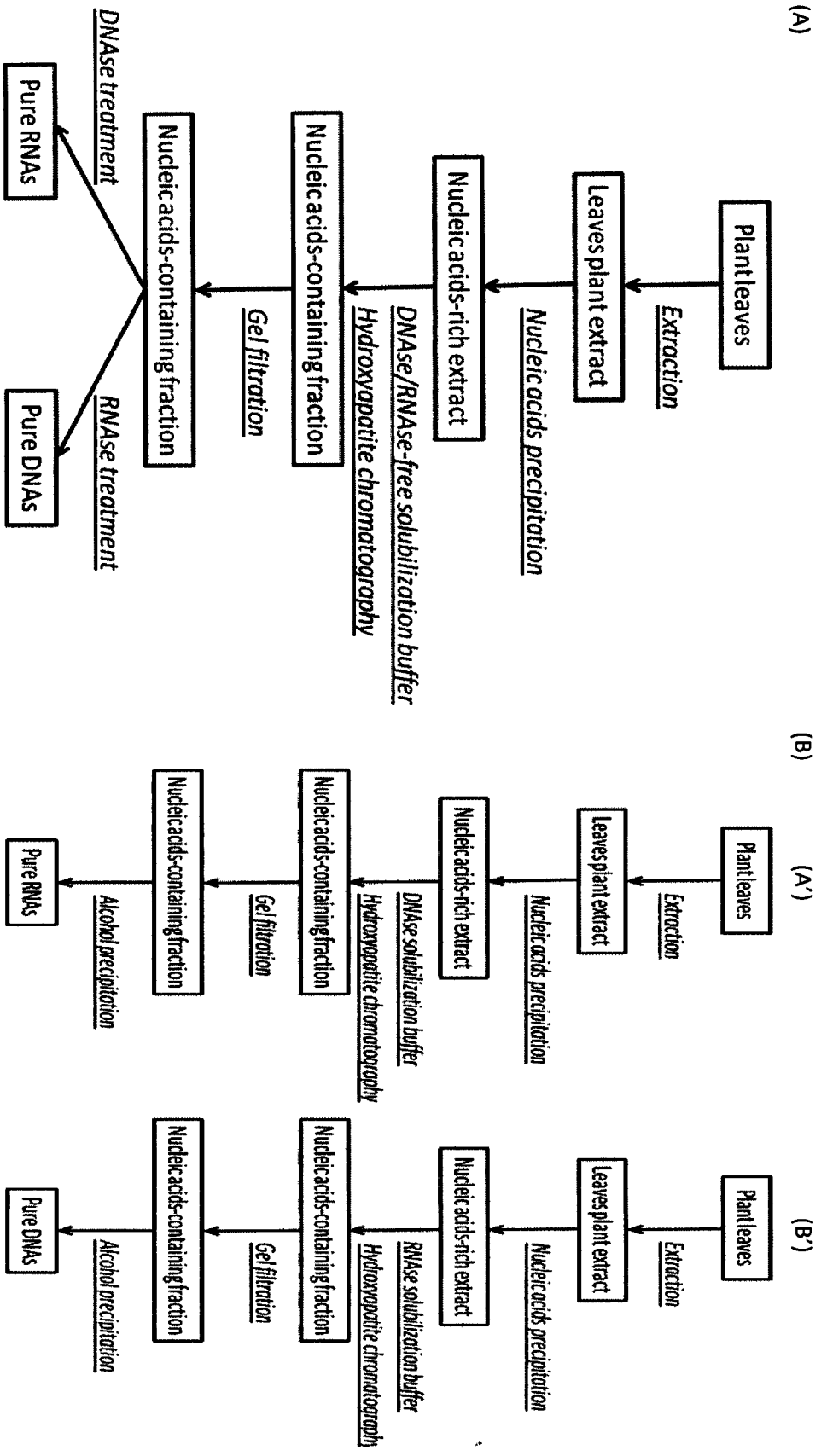
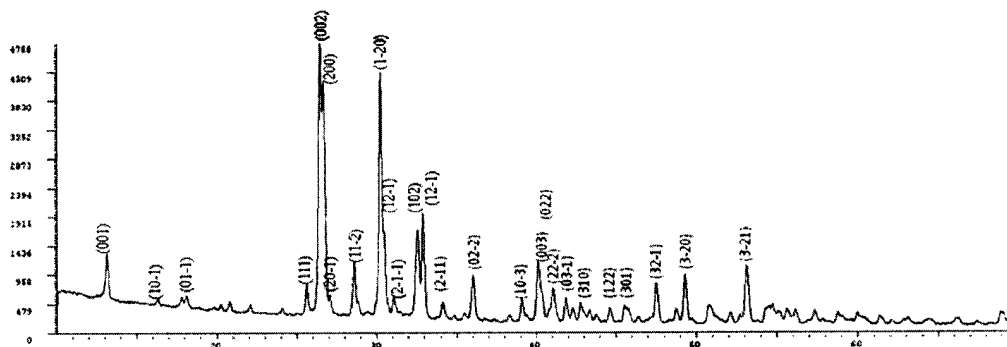


Figure 1

1  
2  
3

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13



14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

Figure 2

Jim G. C. 2

28  
29  
30  
31  
32  
33

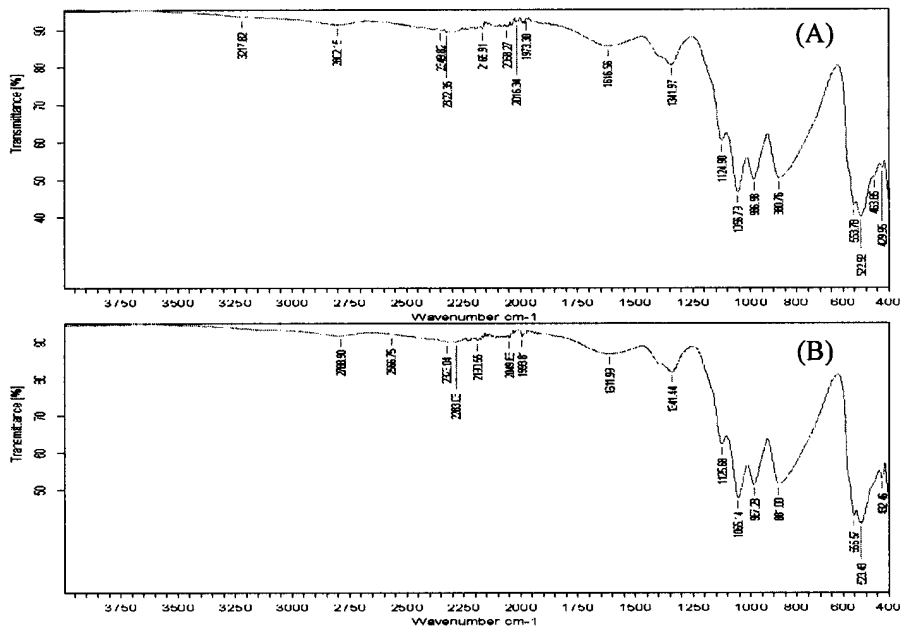
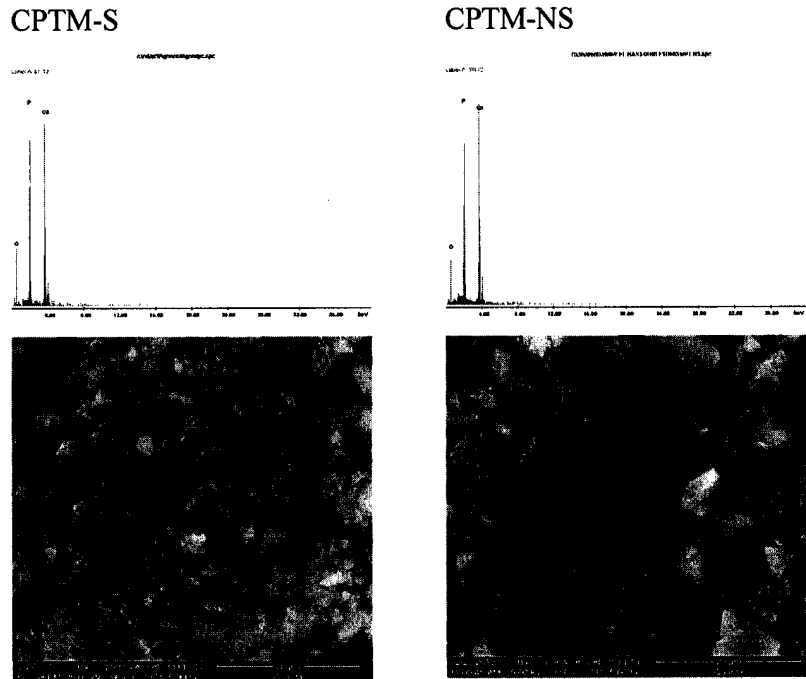


Figure 3

34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

*Turn 4/c*

46  
47  
48  
49  
50



*Figure 4*

51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

*Line 4/c*

63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73

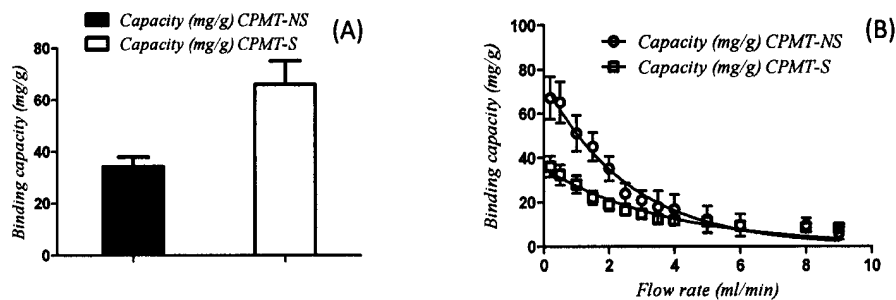
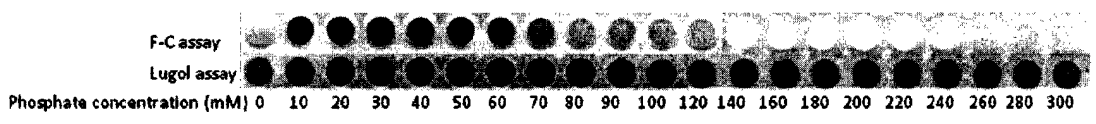


Figure 5

74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85

imm 4/16

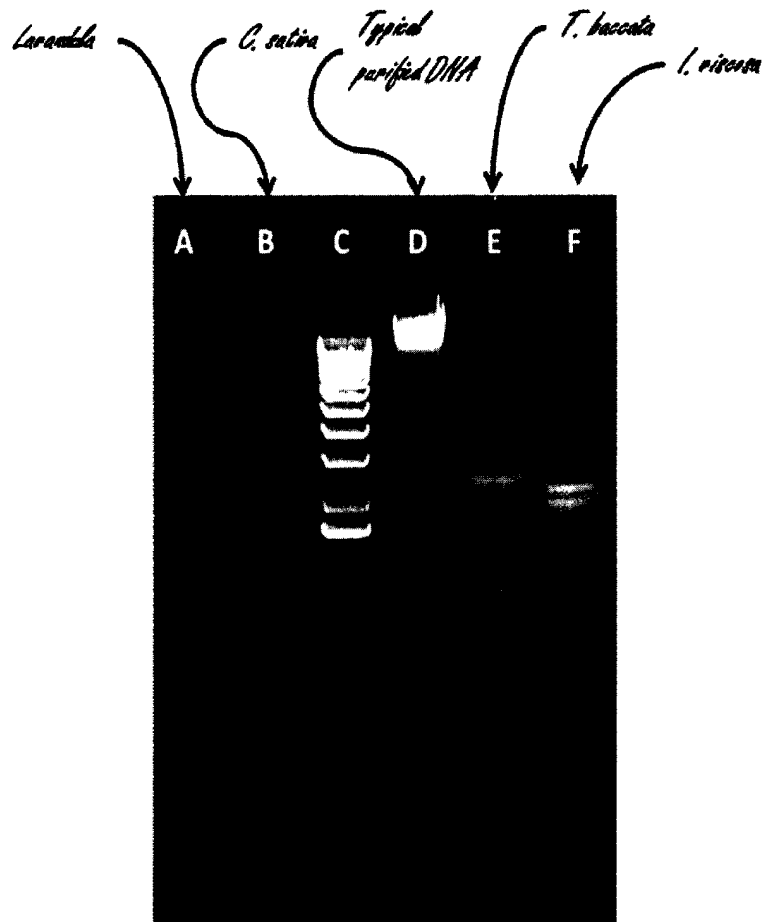
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112



*Fig. 6*

*Time 6/6*

113  
114  
115  
116  
117  
118



119  
120  
121

*Figure 7*

*Jim G/2*  
7

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE

المملكة المغربية

المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97  
relative à la protection de la propriété industrielle)**

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 37111	Date de dépôt : 06/06/2014
Déposant : UNIVERSITE AL AKHAWAYNE A IFRANE	
Intitulé de l'invention : Purification d'acides nucléiques par une nouvelle méthode basée sur la monetite	
<p>Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.</p> <p>Les documents cités par l'examinateur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document</p>	
<p>Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :</p> <p>Partie 1 : Considérations générales</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés</p> <p>Partie 2 : Rapport de recherche</p> <p>Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention</p>	
Examineur: Mouna Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 29/12/2015
Téléphone: 0522586400	
Email : bendaoud@ompic.ma	



**Partie 1 : Considérations générales***Cadre 1 : base du présent rapport*

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
13 Pages
- Planches de dessin  
7 pages
- Revendications  
5

**Partie 2 : Rapport de recherche****Classement de l'objet de la demande :**

CIB : B01J20/02; B01D15/08

CPC : B01J20/02; B01D15/08

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

**EPOQUE, Espacenet, Orbit**

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	US4874511; 1989-10-17; KOKEN KK [JP]	1-5
X	EP0242544; 1987-10-28 ; KOKEN CO. LTD	1-5
X	US5073357 ; 1991-12-17 ; TOA GOSEI CHEM IND [JP]	1-5
A	JPS62202808; 1987-09-07; KOKEN KK [JP] Abrégé	1-5

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« 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

-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs

-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité***Cadre 4 : Remarques de clarté*

La revendication 2 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini, conformément à l'article 35 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

- a) La revendication 2 ne se fonde pas sur la description, étant donné que sa portée est plus large que celle qui est justifiée par la description et porte sur un doublement de méthodes revendiquées.
- b) L'objet décrit aux pages 5-9 n'est pas couvert par les revendications. Cette discordance entre les revendications et la description crée un doute quant à l'objet de la protection demandée, au point que les revendications manquent de clarté.
- c) Caractéristique essentielle omise dans la revendication : Il ressort clairement des pages 5-10 de la description que la caractéristique de l'utilisation des solvants non toxiques est essentielle à la définition de l'invention. La revendication indépendante 1 ne comporte pas cette caractéristique et ne satisfait donc pas à l'exigence de clarté, à savoir qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.

*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 5 Revendications 1-4	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications aucune Revendications 1-5	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-5 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : US4874511; 1989-10-17; KOKEN KK [JP]  
 D2 : EP0242544; 1987-10-28 ; KOKEN CO. LTD  
 D3 : US5073357 ; 1991-12-17 ; TOA GOSEI CHEM IND [JP]  
 D4 : JPS62202808; 1987-09-07; KOKEN KK [JP]

**1. Nouveauté (N) :**

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

L'objet de la 1<sup>ère</sup> revendication manque de nouveauté selon les dispositions de l'article 26 de la loi 17-97. Le document D1 divulgue les caractéristiques techniques de cette revendication. A savoir, un support chromatographique de phosphate de calcium type monetite pour la purification des acides nucléiques.

Par conséquent, l'objet des revendications 1 à 4 n'est pas nouveau.

**2. Activité inventive (AI) :**

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication

"dessaler" l'échantillon à l'issue de la chromatographie est une pratique courante pour l'homme du métier, il est évident pour l'homme du métier d'appliquer cette méthode, la revendication 5 est de ce fait non inventive.

L'objet de la revendications 5 n'est donc pas conforme aux critères d'activité inventive définis par l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.

---