



(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 38765 A1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/06**
(43) Date de publication : **31.07.2017**

(21) N° Dépôt : **38765**

(22) Date de Dépôt : **31.12.2015**

(71) Demandeur(s) : **MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED ELJAZOULI, MADINAT ALIRFANE, RABAT, 10100 RABAT 10100 (MA)**

(72) Inventeur(s) : **RESSAMI EI Mostafa ; AIT BENHASSOU Hassan ; LAKSSIR Brahim**

(74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

(54) Titre : **Méthode et dispositif d'intégration verticale de puce pour l'extraction d'ADN.**

(57) Abrégé : La présente innovation concerne une méthode d'intégration verticale de puces microélectronique (semi-conducteurs) afin d'extraire une séquence d'ADN cible. Cette méthode utilise le principe de filtration par des membranes intelligentes (10) contenant des pores nanométriques pour isoler les molécules/séquences d'ADN, qui vont réagir avec les ingrédients actifs spécifiques de la maladie inclus dans le système de diagnostic. L'ensemble du processus est déclenché automatiquement après le dépôt de l'échantillon du patient dans la zone désignée, et l'application d'un champ électrique qui permettra le déplacement des molécules chargées. L'amplification par la technique PCR ou LAMP est assurée ensuite par un module thermoélectrique (Peltier) qui assurera le thermo-cyclage adéquat. La méthode permet aussi de suivre l'évolution de la résistivité de la solution extraire lors de l'amplification par PCR ou par LAMP. Cette dernière permet la détection et la quantification de la séquence d'ADN cible.

Méthode et dispositif d'intégration verticale de puce pour l'extraction d'ADN

5

Abrégé

10 La présente innovation concerne une méthode d'intégration verticale de puces microélectronique (semi-conducteurs) afin d'extraire une séquence d'ADN cible.

Cette méthode utilise le principe de filtration par des membranes intelligentes (10) contenant des pores nanométriques pour isoler les molécules/séquences d'ADN, qui vont réagir avec les ingrédients actifs spécifiques de la maladie inclus dans le système de
15 diagnostic.

L'ensemble du processus est déclenché automatiquement après le dépôt de l'échantillon du patient dans la zone désignée, et l'application d'un champ électrique qui permettra le déplacement des molécules chargées.

L'amplification par la technique PCR ou LAMP est assurée ensuite par un module
20 thermoélectrique (Peltier) qui assurera le thermo-cyclage adéquat.

La méthode permet aussi de suivre l'évolution de la résistivité de la solution extraire lors de l'amplification par PCR ou par LAMP. Cette dernière permet la détection et la quantification de la séquence d'ADN cible.

25

Méthode et dispositif d'intégration verticale de puce pour l'extraction d'ADN.

5

Domaine de l'invention :

La présente invention concerne le domaine de diagnostic biomédical. En effet, elle concerne une méthode et un dispositif d'extraction de l'ADN utilisables avec tout instrument électronique basé sur les méthodes d'amplification s'appuyant le plus souvent sur de la PCR
10 ou LAMP, qui nécessitent une étape d'extraction d'ADN.

Art antérieur :

Afin d'intégrer pleinement un test PCR ou LAMP sur un dispositif de POC (Point of Care), les étapes suivantes sont nécessaires :

- 15
- a. la lyse des cellules
 - b. l'extraction de l'ADN et l'élimination des inhibiteurs de la PCR
 - c. l'amplification via thermo-cyclage
 - d. et la détection de l'amplicon.

Plusieurs conceptions de laboratoire sur puce (Lab-on-Card) ont été décrites comme des
20 solutions qui intègrent la lyse des cellules et l'extraction d'ADN à l'aide de séparations à base de la micro-fluidique. Cette dernière permet l'étude des fluides dont les canaux d'écoulement mesurant quelques dizaines de micromètres voir des pico mètres, avec un flux

en général horizontal permettant la ségrégation de certains corps en utilisant des propriétés optiques ou électromagnétique lors du contrôle de l'écoulement.

La présente invention a pour objectif d'utiliser une technique de la microélectronique d'empilement verticale de puces semi-conductrices (Stacked Dice) connectées
5 électriquement pour filtrer et extraire l'ADN à partir d'échantillons biologiques liquides (sang, salive, urine, plasma...).

Description détaillée de l'invention

Brève description des figures

10 **Figure 1** : est un schéma de fonctionnement du dispositif avec une prise de vu montrant l'application du champ électrique (E).

Selon un aspect de l'invention, le système d'intégration verticale, objet de la présente invention, se compose de plusieurs puces semi-conductrices (10) qui sont des membranes
15 nano-poreuses. Ces puces membranes sont assemblées verticalement dans un tube transparent (20), dans lequel, est appliqué un champ électrique (E), qui permettra à ce que les particules, chargées négativement, passent par la face avant des membranes empilées, ce qui provoquera leurs déplacements vers le bas du tube induisant ainsi la filtration et l'extraction de l'ADN.

20 Selon un autre aspect de l'invention, le système est doté de moyens pour assurer le cycle d'amplification. Lesdits moyens peuvent être sous forme d'un module thermoélectrique Peltier (30) pour assurer le thermocyclage d'amplification (PCR ou LAMP) après l'extraction de l'ADN.

Selon un autre aspect de l'invention, le tube (20) dispose de deux électrodes (201) qui sont en contact avec la solution extraite (40), pour pouvoir mesurer l'évolution de la résistivité de la solution. Cette dernière permet la détection et la quantification de la séquence d'ADN cible.

5

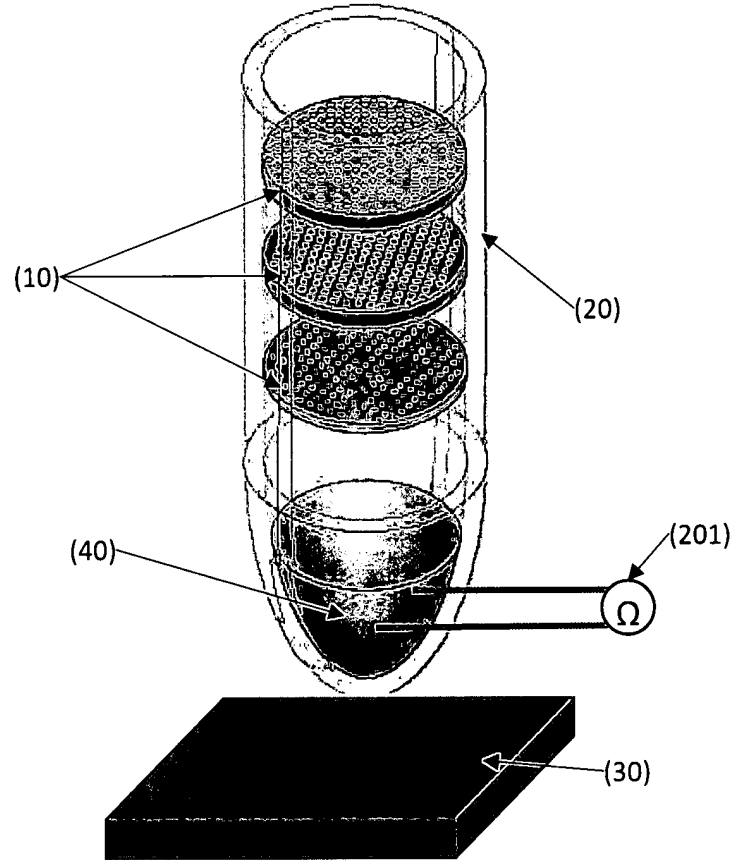
10

15

Revendications :

1. Méthode d'extraction d'acide nucléique (ADN) basée sur la technologie de membranes nano-poreuses (smart membrane) et **caractérisée en ce qu'elle** comprend les étapes suivantes :
 - a- Dépôt de l'échantillon biologique du patient (sang, crachat, urine...) sur le tube de réaction ;
 - b- Application d'un champ électrique provoquant le déplacement de molécules chargées du fluide vers le bas ;
 - c- Extraction (filtration) de la molécule ADN à partir de l'échantillon du patient ;
 - d- Amplification de la solution récupérée pour être utilisée directement dans une réaction (qPCR, PCR ou LAMP)
 - e- Détection et quantification de l'amplification de la séquence d'acide nucléique cible lorsqu'elle est présente dans le mélange réactionnel.
2. Méthode selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** la détection et la quantification est basée sur le changement de la résistivité du mélange réactionnel.
3. Support d'échantillons biologiques pour l'extraction et la détection d'une séquence d'acide nucléique cible des pathogènes de maladies **caractérisé en ce qu'il** comprend :
 - Un tube en plastique (20)
 - Des membranes nano-poreuses (10) à base de silice qui séparent les molécules d'ADN à partir du mélange réactionnel ;
 - Des moyens pour appliquer un champ électrique (E) au niveau desdites membranes (10),
 - De deux électrodes (201) qui sont en contact avec la solution extraite (40), pour pouvoir mesurer l'évolution de la résistivité de la solution.
4. Support d'échantillons biologiques pour l'extraction et la détection d'une séquence d'acide nucléique cible, selon la revendication 3, **caractérisé en ce qu'il** est basé sur la méthode de filtration à l'échelle moléculaire par plusieurs membranes nano-poreuse de différentes tailles de pores.
5. Support d'échantillons biologiques pour l'extraction et la détection d'une séquence d'acide nucléique cible, selon les revendications 3 et 4, **caractérisé en ce qu'il** utilise comme méthode de déplacement de fluide, un champ électrique pour assurer le passage de molécules chargées par les membranes de filtration.
6. Support d'échantillons biologiques pour l'extraction et la détection d'une séquence d'acide nucléique cible, selon les revendications 3 à 5, **caractérisé en ce qu'il** peut être utilisé directement pour une amplification par PCR ou LAMP.

1/1



ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE
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)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 38765	Date de dépôt : 31/12/2015
Déposant : MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	
Intitulé de l'invention : Méthode et dispositif d'intégration verticale de puce pour l'extraction d'ADN.	
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.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée	
<input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: M. Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 25/05/2016
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

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
3 Pages
- Revendications
6
- Planches de dessin
1 Page

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C12N1/06; C12Q1/6806; C12N15/1017

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	"Translocation of double-strand DNA through a silicon oxide nanopore"; 06/05/2005; Storm, A. J., Chen, J. H., Zandbergen, H. W. & Dekker, C http://ceesdekkerlab.tudelft.nl/wp-content/uploads/2005_Storm-3.pdf	1-6
X	« Nanopore sensors for nucleic acid analysis»; 18/09/2011; Bala Murali Venkatesan; Rashid Bashi http://www.nature.com/nnano/journal/v6/n10/pdf/nnano.2011.129.pdf	1 ; 3-6
A	US2003215845 ; 20/11/2003 ; CHOICEPOINT ASSET COMPANY	1-6
A	Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology; 02/03/2015; Yanxiao Feng, Yuechuan Zhang, Cuifeng Ying, Deqiang Wang Chunlei Du http://ac.els-cdn.com/S1672022915000133/1-s2.0-S1672022915000133-main.pdf?tid=e41d3266-6ab3-11e6-91a9-00000aab0f6c&acdnat=1472123334_beead7b1d74c6c528692aa3f32ea300c	1-6

*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

- a) Les revendications 2, 4 ne satisfont 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 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.
- b) Les termes « changement de résistivité » et « différentes tailles » employés respectivement dans les revendications 2 et 4 ont un sens relatif qui n'est pas bien établi, et ils laissent subsister un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se rapportent, au point que l'objet desdites revendications n'est pas clairement défini.
- c) Il ressort clairement de la page 2 de la description que le système d'intégration verticale. est essentiel à la définition de l'invention. La revendication indépendante 1 ne comporte pas ces caractéristiques 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.
- d) L'objet décrit à la page 2 et représenté dans la figure 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.

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

Nouveauté (N)	Revendications 2 Revendications 1 ; 3-6	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications aucune Revendications 1-6	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-6 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 : "Translocation of double-strand DNA through a silicon oxide nanopore"; 06/05/2005; Storm, A. J., Chen, J. H., Zandbergen, H. W. & Dekker, C

D2 : « Nanopore sensors for nucleic acid analysis»; 18/09/2011; Bala Murali Venkatesan; Rashid Bashi

D3 : US2003215845 ; 20/11/2003 ; CHOICEPOINT ASSET COMPANY

D4 : Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology; 02/03/2015; Yanxiao Feng, Yuechuan Zhang, Cuifeng Ying, Deqiang Wang Chunlei Du

1. Nouveauté (N) :

L'objet de la 1ère revendication manque de nouveauté selon les dispositifs de l'article 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13. Le document D1 divulgue les caractéristiques techniques de ces revendications

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit l'utilisation la résistivité du mélange comme paramètre de mesure, d'où l'objet de la revendication 2 est nouveau.

Les revendications 1 et 3 à 6 ne remplissent pas les conditions énoncées dans l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

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 1 décrit des expériences translocation de double brin de l'ADN utilisant des nanopores d'oxyde de silicium ayant un diamètre d'environ 10 nm. En surveillant la conductivité d'un pore de tension polarisée, sont détecté les molécules d'une longueur allant de 6557 à 48 500 paires de bases, les nanopores peuvent être utilisées pour distinguer les longueurs des fragments d'ADN présents dans le mélange, par conséquent l'objet de la revendication 2 diffère de D1 par la technique de quantification de l'échantillon obtenue

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la quantification directe de l'échantillon, or le document D1 décrit une technologie qui permet d'identifier les nucléotides selon leur conductance.

En raison du lien entre les deux paramètres la résistivité (ρ) et la conductance (G) $\rho = 1/G \times S/L$; il est évident pour l'homme du métier de remplacer l'une des mesures de paramètre par l'autre.

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, l'objet de la revendication 2 n'étant pas conforme au critère d'activité inventive.

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