

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 17/05/2018

(21) Numéro de demande : BE2016/5781

(22) Date de dépôt : 18/10/2016

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : B01J 19/10, C12N 15/10, B01L 3/00, B01L 9/06, B01L 9/00, B06B 3/00, C12Q 1/68

(30) Données de priorité :

(71) Demandeur(s) :

DIAGENODE SA
4102, SERAING
Belgique

(72) Inventeur(s) :

PANTELEEVA Irina
4102 SERAING
Belgique

ANSAY Gilles
4100 SERAING
Belgique

KROONEN Jerome
4000 LIEGE
Belgique

(54) SUPPORT POUR TUBES D'ÉCHANTILLON POUR LA SONICATION D'UN MATÉRIEL BIOLOGIQUE

(57) Kit d'assemblage, comprenant un dispositif de sonication (10) et un support (20) de tubes d'échantillon (30). Le dispositif comprend une cuve (13) et un générateur d'ondes ultrasonores (15) couplé à la cuve et conçu pour générer des ondes ultrasonores ayant une fréquence comprise entre 20 kHz et 80 kHz. La cuve comprend une indication (132) d'un niveau (133) de liquide. Le support pour tubes d'échantillon comprend un moyen de soutien (21) de plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, une tige (22) solidarisée au moyen de soutien, et un moyen de suspension (23) de la tige dans la cuve. La tige a une longueur telle qu'en position d'assemblage, les tubes d'échantillon (30) sont positionnés avec leur extrémité inférieure entre 8 mm et 12 mm en dessous de l'indication (132) du niveau de liquide.

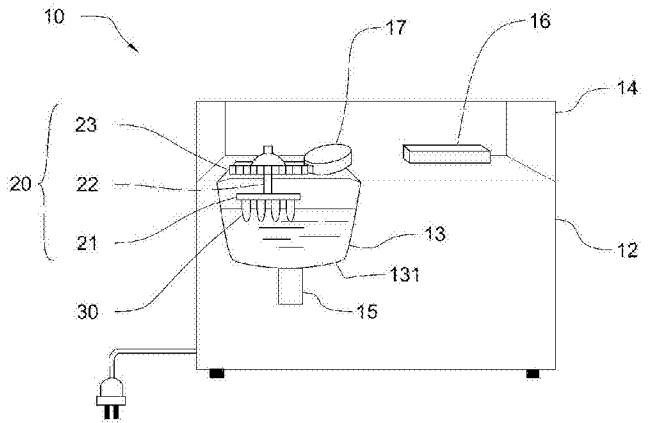


FIG 1

Support pour tubes d'échantillon pour la sonication d'un matériel biologique

[0001] La présente invention concerne des dispositifs, des supports et des procédés pour la fragmentation d'un matériel biologique, en particulier de l'ADN. En particulier, la présente invention concerne des dispositifs et des procédés de
5 fragmentation dudit matériel biologique par cisaillement à l'aide d'ondes ultrasonores, également appelée sonication.

[0002] L'utilisation d'un ultrason pour créer une contrainte mécanique focalisée afin de rompre des parois cellulaires est connue depuis longtemps, par exemple de GB 1363934 et US 4874137. Les ondes ultrasonores passent à travers
10 l'échantillon, dilatant et contractant le liquide. Au cours de la dilatation, les molécules sont éloignées les unes des autres et des cavités ou des bulles sont formées lors d'un processus appelé cavitation. La bulle continue à absorber de l'énergie jusqu'à ce qu'elle ne puisse plus se maintenir puis implose, produisant des forces de cisaillement focalisées intenses qui rompent les parois cellulaires.

[0003] Il est connu qu'une excitation indirecte dudit matériel biologique par des ondes ultrasonores générées à un emplacement à distance et amenées à se propager à travers un ou plusieurs milieux avant d'arriver au matériel à fragmenter donne de meilleurs résultats. L'excitation indirecte est sensée provoquer une excitation plus douce, de sorte que des fragments plus uniformes soient obtenus.

[0004] L'utilisation d'ondes ultrasonores de fréquence comprise entre 20 kHz et 40 kHz pour fragmenter des séquences de l'ADN et de l'ARN est également connue du document EP 2511380 du 17 octobre 2012 au nom de la Demanderesse. L'utilisation d'une fréquence comprise entre 28 kHz et 80 kHz permet d'obtenir des distributions de tailles inférieures pour les fragments obtenus, de réduire le temps
25 nécessaire pour obtenir de tels fragments et d'utiliser des intensités énergétiques ultrasonores inférieures pour cisailier, par comparaison avec une fréquence moins élevée, en particulier 20 kHz.

[0005] Plusieurs appareils appropriés pour la fragmentation de l'ADN par ultrasons sont commercialisés par la Demanderesse sous les noms Bioruptor® Plus et
30 Bioruptor® Pico (Diagenode, Belgique). Des échantillons d'ADN ou de chromatine sont mis en suspension dans une solution liquide dans un tube d'échantillon. Le tube d'échantillon est mis en suspension dans une cuve remplie d'un milieu liquide (généralement de l'eau). Des transducteurs à ondes ultrasonores sont couplés à la paroi inférieure de la cuve. Lors de l'activation des transducteurs, les ondes ultrasonores ayant

une fréquence comprise entre 20 kHz et 60 kHz sont générées au niveau de la paroi inférieure de la cuve et se propagent à travers le milieu liquide vers le tube d'échantillon. A partir du tube d'échantillon, les ondes ultrasonores sont transmises à son contenu, qui ensuite subit des contraintes mécaniques tel qu'indiqué ci-dessus.

5 **[0006]** Les tubes d'échantillon utilisables dans les appareils susmentionnés ont une taille qui peut varier entre 0,1 ml et 50 ml. Il existe une tendance dans la fragmentation de l'ADN à fragmenter des échantillons de plus petit volume. Un volume préféré de solution d'ADN soumis à des ondes ultrasonores est de 50 µl. Pour ce volume, des tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, également appelés
10 « microtubes », sont de préférence utilisés.

[0007] Il a été observé que les résultats obtenus avec ce type de tube d'échantillon sont fortement aléatoires. Par conséquent, la présente invention a pour but de fournir des dispositifs et des procédés qui permettent d'éviter les inconvénients susmentionnés. En particulier, un but de l'invention est de fournir des dispositifs, voire
15 des kits d'assemblage, et des procédés permettant de fragmenter un matériel biologique dans des tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, de sorte que des fragments ayant une petite variance/un petit écart-type en taille soient obtenus.

[0008] Un autre but de l'invention est de fournir des dispositifs, voire des kits d'assemblage, et des procédés qui permettent de diminuer le temps nécessaire pour
20 fragmenter l'ADN et d'augmenter le débit en utilisant des tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml.

[0009] Selon un premier aspect, l'invention concerne un kit d'assemblage tel que repris dans les revendications annexées. Le kit d'assemblage selon l'invention comprend un dispositif de sonication, un support pour tubes d'échantillon, et
25 facultativement plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml. Le dispositif de sonication comprend une cuve et au moins un générateur d'ondes ultrasonores couplé à une face externe de la cuve. Ce générateur d'ondes ultrasonores est avantageusement conçu pour générer des ondes ultrasonores ayant une fréquence comprise entre 20 kHz et 80 kHz. La cuve comprend une indication du niveau de liquide dans la cuve. Le
30 support pour tubes d'échantillon comprend un moyen de soutien de plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, une tige ayant une extrémité inférieure et une extrémité supérieure, et un moyen de suspension de la tige dans la cuve. La tige est solidarisée au moyen de soutien à son extrémité inférieure.

[0010] Selon le présent aspect, la tige a une longueur telle qu'en position
35 d'assemblage, les tubes d'échantillon introduits dans le moyen de soutien sont positionnés avec leur extrémité inférieure entre 8 mm et 12 mm en dessous de

l'indication du niveau de liquide, de préférence entre 9 mm et 11,5 mm, de préférence entre 9,5 mm et 11 mm.

[0011] De manière surprenante, il a été observé qu'un positionnement des tubes d'échantillon à la profondeur susmentionnée permet d'obtenir une fragmentation
5 extraordinairement plus efficace, et donc de réduire le temps de sonication pour ce type de tubes d'échantillon, et par conséquent, d'augmenter le débit des kits d'assemblage du type susmentionné. Avec un temps de sonication réduit, il est possible d'obtenir une distribution de taille de fragments très étroite, ce qui facilite l'utilisation dans des applications ultérieures.

10 **[0012]** Selon un deuxième aspect, l'invention concerne un support pour tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml conçu pour être utilisé dans le kit d'assemblage décrit ci-dessus. Le support pour tubes d'échantillon comprend un moyen de soutien de plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, une tige ayant une extrémité inférieure et une extrémité supérieure, et un moyen de suspension de la tige dans la
15 cuve. La tige est solidarisée au moyen de soutien à son extrémité inférieure.

[0013] Selon le présent aspect, la tige a une longueur telle qu'en position d'assemblage du support dans une cuve d'un dispositif de sonication à bain de liquide, les tubes d'échantillon introduits dans le moyen de soutien sont positionnés avec leur extrémité inférieure entre 8 mm et 12 mm en dessous d'une indication du niveau de
20 liquide, de préférence entre 9 mm et 11,5 mm, de préférence entre 9,5 mm et 11 mm.

[0014] Selon un troisième aspect, l'invention concerne un procédé de fragmentation d'un matériel biologique tel que repris dans les revendications annexées.

[0015] Des aspects supplémentaires de l'invention sont énoncés dans les revendications dépendantes annexées.

25 **[0016]** D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description et des exemples donnés ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux dessins annexés.

[0017] La Figure 1 représente une vue de face d'un dispositif de sonication et d'un support constituant un kit d'assemblage selon l'invention.

30 **[0018]** La Figure 2 représente une vue de dessus du dispositif de la Figure 1.

[0019] La Figure 3 représente un graphique de génération intermittente (cyclique) d'ondes ultrasonores.

[0020] La Figure 4 représente une vue en perspective et de face d'une
35 plaque de soutien pour tubes d'échantillon selon les différents aspects de l'invention.

[0021] La Figure 5 représente une vue en perspective d'un tube d'échantillon (microtube) utilisé dans les kits d'assemblage de l'invention.

[0022] La Figure 6 représente une vue en perspective d'une plaque de serrage des tubes d'échantillon utilisée dans le support selon les différents aspects de l'invention.

[0023] La Figure 7 représente un détail de la Fig. 1, montrant la manière de suspendre des tubes d'échantillon dans la cuve d'un dispositif de sonication utilisant le support selon les différents aspects de l'invention.

[0024] La Figure 8 représente un graphique de la distribution de tailles de fragments de séquence d'ADN tels qu'obtenus dans l'exemple 1 décrit ci-après. La distribution de tailles (en paire de bases) est représentée graphiquement par rapport à des Unités de Fluorescence (FU).

[0025] Les Figures 9 et 10 représentent chacune un graphique de la distribution de tailles de fragments de séquence d'ADN tels qu'obtenus dans les exemples comparatifs décrits ci-après à l'exemple 1. La distribution de tailles (en paire de bases) est représentée graphiquement par rapport à des Unités de Fluorescence (FU). La Figure 9 se rapporte à une sonication avec suspension des échantillons dans le bain d'eau à une profondeur de 13 mm. La Figure 10 se rapporte à une sonication avec suspension des échantillons dans le bain d'eau à une profondeur de 7,3 mm.

[0026] Certains aspects de l'invention concernent la fragmentation d'un matériel biologique. Par le terme « matériel biologique », on entend par exemple, au sens de la présente invention, de l'ADN, de l'ARN, des échantillons de tissus biologiques, des bactéries, des virus, des cellules animales ou végétales. En particulier pour la fragmentation de l'ADN, on utilise dans les procédés selon l'invention comme matière de base de l'ADN génomique ou plasmidique, ou de l'ADN ayant une taille supérieure ou égale à 10 000 paires de base (pb).

[0027] La fragmentation est effectuée par cisaillement à l'aide d'ondes ultrasonores. Selon un aspect de l'invention, des ondes ultrasonores ayant une fréquence supérieure ou égale à environ 20 kHz, de préférence supérieure ou égale à environ 28 kHz, de préférence supérieure ou égale à environ 36 kHz, et inférieure ou égale à environ 80 kHz, de préférence inférieure ou égale à environ 60 kHz et de préférence inférieure ou égale à environ 50 kHz, sont utilisées. Les limites de fréquence supérieure et inférieure indiquées peuvent être combinées pour donner des plages de fréquence optimales.

[0028] De telles ondes ultrasonores peuvent être générées par des transducteurs connus, tels que des transducteurs piézoélectriques ou magnétostrictifs.

L'excitation du matériel biologique par les ondes ultrasonores est indirecte, en ce que les ondes ultrasonores sont générées à un emplacement à distance et sont amenées à se propager à travers un ou plusieurs milieux avant d'arriver à la séquence. L'excitation indirecte est sensée provoquer une excitation plus douce, de sorte que des fragments plus uniformes soient obtenus.

[0029] En référence aux Figures 1 et 2, l'invention concerne un kit d'assemblage comprenant un dispositif 10 dit de sonication, capable de soumettre une solution de matériel biologique à des ondes ultrasonores conformément aux différents aspects de la présente invention. Une telle solution peut être liquide ou de type gel, telle qu'elle est connue dans l'état de la technique. Le dispositif de sonication 10 de la Figure 1 est similaire du point de vue de la construction à des appareils tels que décrits dans le brevet US 4874137, dont la référence est incorporée ici par référence.

[0030] Le dispositif 10 comprend un corps principal 12 qui contient une cuve 13 configurée pour contenir un liquide, de préférence de l'eau distillée. Le dispositif 10 peut être fermé par un couvercle 14.

[0031] Un ou plusieurs générateurs d'ondes ultrasonores (transducteurs) 15 sont couplés de façon externe à la cuve 13, de préférence à la face externe du fond 131 de la cuve 13. Les transducteurs 15 peuvent être de type piézoélectrique ou magnétostrictif et sont configurés pour générer des vibrations mécaniques ayant une fréquence telle qu'indiquée et qui sont transmises à la cuve 13.

[0032] Les transducteurs 15 peuvent être connectés électriquement à une unité de commande et d'alimentation en énergie 16 qui peut être configurée pour commander l'un ou plusieurs des paramètres suivants : la fréquence d'excitation, la puissance, la durée et tout autre paramètre réglable associé à la génération des ondes ultrasonores. L'unité de commande 16 est, de façon avantageuse, dotée d'une interface utilisateur 161, via laquelle un ou plusieurs des paramètres indiqués ci-dessus peuvent être réglés. A titre d'exemple, l'interface utilisateur 161 peut être dotée d'un ou plusieurs boutons de commande et/ou de réglage 162. Les paramètres peuvent être visualisés sur un écran 163.

[0033] De plus, l'unité de commande 16 peut être configurée pour une génération intermittente d'ondes ultrasonores. Les transducteurs 15 peuvent être configurés pour fonctionner en intermittence, par exemple en cycles (égaux) formés d'une période active (T_a) où les transducteurs sont actifs et génèrent des ondes ultrasonores, et d'une période inactive (T_i) où les transducteurs sont inactifs et ne génèrent pas d'ondes ultrasonores, tel qu'illustré sur la Figure 3. La somme des périodes de temps active et inactive à l'intérieur d'un cycle unique est appelée période

de cycle T_c . Le rapport de période active T_a à la période de cycle T_c est appelé rapport cyclique. Les périodes de cycle possibles tombent dans la plage se situant entre environ 2 s et environ 6 minutes (360 s), des périodes de cycle entre environ 30 s et environ 3 minutes (180 s) étant préférées. Des rapports cycliques possibles tombent dans la plage
5 se situant entre environ 0,1 (10 %) et environ 0,8 (80 %), de préférence entre environ 0,3 et environ 0,7.

[0034] Le kit d'assemblage selon l'invention comprend en outre un support
20 pour tubes d'échantillon conçu pour suspendre les tubes d'échantillon comprenant la solution de matériel biologique à fragmenter dans la cuve 13. A cet effet, le support 20
10 comprend une plaque 21 de soutien de plusieurs tubes d'échantillon telle que représentée à la Figure 4. La plaque 21, qui est avantageusement de forme circulaire, comprend plusieurs trous 211 disposés de manière avantageuse à la périphérie de la plaque. De manière avantageuse, les trous 211 ont un espacement uniforme et sont
15 disposés en cercle de manière à ce que chaque trou 211 soit positionné à une même distance R du centre 212 de la plaque 21.

[0035] Les trous 211 ont un diamètre permettant l'insertion d'un tube
d'échantillon de taille prédéterminée, en particulier d'une taille de 0,2 ml. En référence à la Figure 5, le tube d'échantillon 30 comprend un corps principal 31 qui, dans une partie
inférieure, est avantageusement de forme conique, se terminant en pointe à l'extrémité
20 inférieure 32. Le corps principal 31 comprend une partie supérieure qui est avantageusement de forme cylindrique. À l'extrémité supérieure 33, le corps principal 31 se termine en un rebord 34 en saillie par rapport au corps principal et auquel est
avantageusement attaché un capuchon 35. Les tubes d'échantillon 30 sont insérés dans
25 des trous 211 de la plaque 21 de manière à ce que le corps principal 31 passe à travers
des trous 211, le rebord 34 s'appuyant sur la face supérieure de la plaque 21. Les tubes
d'échantillon d'une taille de 0,2 ml ont avantageusement une longueur totale (mesurée
de l'extrémité inférieure à l'extrémité supérieure) comprise entre 20,9 mm et 21,8 mm.

[0036] Des tubes d'échantillon faits en polypropylène, polyméthylpentène
ou polycarbonate peuvent être utilisés. Il a été observé qu'un tube d'échantillon fait en
30 polypropylène donne de meilleurs résultats, par exemple les tubes de 0,2 ml commercialisés par Diagenode (Belgique), référence C30010020.

[0037] Une tige 22 est solidarisée via son extrémité inférieure au centre
212 de la plaque 21, par exemple par vissage. La tige 22 s'étend vers le haut par rapport
à la plaque 21 jusqu'à ce que son extrémité supérieure rejoigne un élément 23 situé au-
35 dessus de la cuve 13. La tige 22, la plaque 21 et par conséquent les tubes d'échantillon
30 insérés dans les trous 211 de la plaque 21 sont suspendus dans la cuve 13 au moyen

de l'élément 23. Cet élément 23 prend avantageusement la forme d'une roue d'engrenage 23. Cette roue d'engrenage 23 est soutenue par un couvercle 24 qui couvre la cuve 13. Le dispositif 10 est avantageusement muni d'un actionneur électrique 17 disposé au niveau du couvercle 24, de manière à engrener la roue 23 et la faire tourner
5 autour d'un axe vertical correspondant avantageusement à l'axe de la tige 22. Ce système permet avantageusement de faire tourner la plaque de soutien 21 à une vitesse comprise entre 15 tr/min et 1 tr/min, de préférence entre 8 tr/min et 2 tr/min. Alternativement, le support 20 peut être suspendu dans la cuve 13 en position fixe. Il conviendra de noter que le support 20 est assemblé de manière amovible dans la cuve
10 13.

[0038] En référence à la Figure 6, le support 20 comprend avantageusement une plaque 25 dit de serrage qui vient se fixer sur la plaque 21. La plaque de serrage 25 est fixée de manière à serrer les extrémités supérieures 33 des tubes d'échantillon 30 sur la plaque 21 et la plaque 25. La plaque de serrage 25 peut par
15 exemple comprendre un trou central 251 dans lequel vient s'insérer la tige 22 avant de visser la tige à la plaque 21. La tige 22 est avantageusement munie d'un épaulement configuré pour pousser la plaque de serrage 25 contre la plaque 21.

[0039] Pour un fonctionnement optimal du dispositif 10, la cuve 13 doit notamment être remplie d'un liquide jusqu'à un niveau 133 prédéterminé. A cet effet, et
20 en référence à la Figure 7, la cuve 13 comprend une indication 132 d'un niveau de remplissage de liquide, avantageusement pourvue sur une paroi de la cuve 13. Les tubes d'échantillon 30 sont suspendus par le support 20 de manière à être partiellement immergés dans le liquide. La plaque 21 de soutien des tubes d'échantillon 30 est avantageusement placée de manière à rester au-dessus du niveau 133 de liquide.

[0040] De façon surprenante, dans le cadre de la présente invention, il a été observé que, spécifiquement pour les tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, le positionnement vertical des tubes d'échantillon par rapport au niveau 133 de liquide est critique pour une fragmentation efficace des échantillons. Il a été observé que la profondeur d'immersion D des tubes d'échantillon 30 doit entrer dans la plage entre 8
25 mm et 12 mm, avantageusement dans la plage entre 9 mm et 11,5 mm, afin d'obtenir une fragmentation significativement plus efficace, permettant de réduire le temps de sonication, et donc d'augmenter le débit en termes d'unité d'échantillons traités par unité de temps. Comme illustré dans les exemples décrits ci-dessous, cette distance est indépendante du type de dispositif 10 utilisé, et donc semble être une règle générale
30 applicable à des tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml. En d'autres termes, le support 20 doit être conçu de manière à maintenir la distance D entre l'indication 132 du niveau

de liquide de la cuve 13 et l'extrémité inférieure des tubes d'échantillon 30 dans la plage susmentionnée. Cette distance D peut être garantie en choisissant par exemple une longueur appropriée de la tige 22.

[0041] La distance D susmentionnée est avantageusement maintenue pendant toute l'opération de fragmentation d'un échantillon. Cette distance D est avantageusement fixe.

[0042] Avantageusement, le nombre de tubes d'échantillon 30 qui peuvent être aménagés sur la plaque 21 dépend de la distance R d'aménagement des trous par rapport au centre 212 de la plaque 21. De manière avantageuse, le nombre de tubes d'échantillon 30 à prévoir, et donc, des trous 211 à aménager sur la plaque 21, est compris entre 12 et 36. De manière avantageuse, ces trous 211 sont aménagés sur la circonférence d'un cercle avec un rayon R compris entre 25 mm et 50 mm, par exemple entre 30 mm et 45 mm. Un rapport optimal entre le nombre de trous 211 et le rayon R du cercle sur lequel ils sont disposés est avantageusement inférieur ou égal à 0,7, avantageusement inférieur ou égal à 0,67, dans lequel R est exprimé en mm. La variance de la taille des fragments obtenus est significativement réduite quand les tubes d'échantillon sont aménagés comme décrit ci-dessus. Le rayon R n'est pas limitant : la contrainte pour R dépend de la taille de la cuve 13.

[0043] Pour un traitement optimisé, la solution devrait, de préférence, être maintenue à une température comprise entre 4°C et 10°C, même pendant le traitement. Puisque l'excitation ultrasonore provoque une augmentation de température, le dispositif 10 comprend, de préférence, une unité de contrôle de température (unité de refroidissement) configurée pour maintenir la solution à une température prédéterminée. L'unité de contrôle de température peut être intégrée au dispositif 10, ou alternativement être pourvu comme dispositif externe.

[0044] Les kits d'assemblage tels que décrits ci-dessus peuvent être utilisés, de façon avantageuse, pour mettre en œuvre les procédés de l'invention. Afin de réaliser de tels procédés, le matériel biologique de départ est avantageusement conditionné de façon appropriée. Dans le cas particulier d'une séquence d'ADN, cette étape peut comprendre une étape d'extraction et de purification de la séquence d'ADN à partir d'un échantillon biologique contenant de l'ADN, tel qu'une cellule ou un tissu.

[0045] Le procédé comprend ensuite la dissolution du matériel biologique à fragmenter dans une solution de sonication. Dans le cas particulier d'une séquence d'ADN, cette étape comprend la dissolution de la séquence d'ADN obtenue dans un tampon de sonication, tel qu'un tampon TE (tampon Tris-EDTA) ayant un pH se situant dans la plage entre environ 7,5 et environ 8,0. D'autres étapes de conditionnement, telles

que l'ajout à la solution contenant de l'ADN d'un support solide, d'une solution organique, d'un détergent, d'un polymère chargé positivement ou de molécules organiques, peuvent être intéressantes.

- [0046]** La concentration du matériel biologique dans la solution de sonication tombe, de préférence, dans la plage se situant entre environ 0,001 µg/µl (1 ng/µl) et environ 0,5 µg/µl, de préférence entre environ 0,001 µg/µl et environ 0,25 µg/µl, de préférence entre environ 0,001 µg/µl et environ 0,1 µg/µl. De cette solution, un volume de préférence inférieur ou égal à 100 µl, de préférence inférieur ou égal à 60 µl, de préférence 50 µl, est placé dans le tube d'échantillon 30.
- 10 **[0047]** Le tube d'échantillon ayant un volume isolé de solution de sonication est ensuite suspendu dans le bain liquide de la cuve 13. A cet effet, le tube d'échantillon 30 est inséré dans un trou 211 de la plaque 21 qui est solidarisée à la tige 22 et suspendue dans la cuve 13 remplie de liquide, en particulier de l'eau, tel que de l'eau distillée, jusqu'au niveau 133 indiqué par l'indication 132 de niveau.
- 15 **[0048]** Dans une étape suivante, le tube d'échantillon est soumis à l'action d'ondes ultrasonores de fréquence telle qu'indiquée. Un ou plusieurs protocoles peuvent être établis pour la mise en œuvre d'un traitement de cisaillement/fragmentation selon l'invention afin d'obtenir des fragments de taille souhaitée (moyenne) et ayant des distributions de tailles étroites. De préférence, les procédés de l'invention permettent de
- 20 fragmenter le matériel biologique en fragments avec une distribution de tailles ayant un coefficient de variance inférieur à 18%, de préférence inférieur ou égal à 15 %, de préférence inférieur ou égal à 12 %, de préférence inférieur ou égal à 10%. Le protocole peut comprendre une sélection de la durée du traitement et/ou de la périodicité (intermittente ou continue) du traitement. Les valeurs préférées pour la durée et la
- 25 périodicité sont celles indiquées ci-dessus. Le protocole souhaité peut être programmé dans le dispositif 10 au moyen de l'interface utilisateur 161.
- [0049]** Le dispositif 10 est ensuite mis en marche. Le transducteur 15 excite la paroi de la cuve 13. Les vibrations mécaniques de la cuve 13 se propagent à travers le bain liquide sous la forme d'ondes de pression (ultrasonores) de même
- 30 fréquence. Le tube d'échantillon 30 est excité, y compris la solution de sonication.
- [0050]** Avantagusement, l'actionneur 17 est utilisé pour faire tourner le support 20 et les tubes d'échantillon 30 autour de l'axe vertical de la tige 22.

Exemple 1 : Effet de la profondeur d'immersion des tubes d'échantillon

- 35 **[0051]** Préparation d'échantillon : pour chaque échantillon test, un échantillon d'ADN génomique humain (taille initiale certifiée de 50000 pb) a été dissous

dans un tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) à une concentration de 10 ng/μl afin d'obtenir une solution de sonication. Plusieurs échantillons de sonication ont été obtenus en plaçant chaque fois un volume de 50 μl de la solution dans un microtube à faible affinité de 0,2 ml Diagenode® (numéro de catalogue C30010020). L'échantillon, à
5 capuchon fermé, a été agité au vortex doucement pendant 10 sec puis centrifugé pendant 10 sec pour recueillir l'échantillon au fond du tube avant qu'il ne soit soumis aux ondes ultrasonores.

[0052] Un total de seize (16) de ces microtubes ont été introduits dans une plaque de soutien telle que représentée à la Fig. 4. Cette plaque comprend un total de
10 16 trous 211 aménagés à 30 mm du centre 212 de la plaque. La plaque a été montée sur un support 20 et introduite dans un dispositif de sonication Bioruptor® Pico de manière à positionner les microtubes à une profondeur D (voir Fig. 7) de 10,3 mm du niveau du bain d'eau. Le support 20 était muni d'une roue d'engrenage 23, couplée à un moteur électrique 17 conçus pour tourner la plaque de soutien avec les microtubes
15 autour d'un axe vertical (axe de la tige 22) à une vitesse de 4 tr/min.

[0053] La fréquence de sonication était de 40 kHz. Une sonication de 13 cycles (30 s période active/30 s période inactive) a été appliquée dans un bain d'eau distillée à 4°C. Les fragments d'ADN obtenus ont été analysés par un Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies, Inc.) et leur taille moyenne et coefficient
20 de variance (CV) ont été calculés.

[0054] Les résultats sont repris à la Fig. 8. La taille moyenne des fragments était de 219 pb et le CV de 4,2%.

Exemples comparatifs

25 **[0055]** La solution de sonication de l'exemple 1 a été utilisée pour obtenir 32 échantillons de sonication suivant la même procédure que pour l'exemple 1 (microtubes de 0,2 ml ; chacun avec échantillon de 50 μl). La plaque de soutien de l'exemple 1 a été utilisée. Cependant, une première tige plus courte et une deuxième plus longue de celle utilisée pour l'exemple 1 ont été utilisées pour suspendre la plaque
30 de soutien dans la cuve.

[0056] Dans un premier exemple comparatif, 16 microtubes ont été introduits dans les trous de la plaque de soutien et suspendus dans le Bioruptor® Pico de manière à positionner les microtubes à une profondeur D de 13,0 mm utilisant la deuxième tige pour le support.

[0057] La même procédure de sonication que celle décrite dans l'exemple 1 a été appliquée. Les résultats après 13 cycles de sonication sont représentés à la Fig. 9. On peut noter une absence presque totale de fragmentation.

[0058] Dans un second exemple comparatif, les autres 16 microtubes ont
5 été introduits dans les trous de la plaque de soutien et suspendus dans le Bioruptor® Pico de manière à positionner les microtubes à une profondeur D de 7,3 mm utilisant la première tige pour le support.

[0059] La même procédure de sonication que celle décrite dans l'exemple 1 a été appliquée. Les résultats après 13 cycles de sonication sont représentés à la Fig.
10 10. On peut noter que des fragments de taille beaucoup plus large (environ 2000 pb) ont été obtenus.

[0060] On peut donc déduire des exemples ci-dessus que la suspension à une profondeur D de 10,3 mm donne des résultats extraordinairement meilleurs qu'une suspension à 7,3 ou 13 mm.

15

Exemple 2 : Influence des dimensions de la plaque de soutien des tubes d'échantillon

[0061] Les échantillons de sonication ont été obtenus suivant le procédé de l'exemple 1. Ces échantillons ont été fragmentés en utilisant des plaques de soutien
20 de dimensions différentes. Les éléments caractéristiques de ces plaques sont le nombre de trous d'introduction des microtubes et la distance R d'aménagement des microtubes du centre de la plaque. Dans chaque plaque, des trous d'introduction sont aménagés sur un cercle de rayon R avec espacement uniforme.

[0062] La même procédure de sonication que celle décrite dans l'exemple
25 1 a été appliquée. La profondeur d'immersion des microtubes D était de 10,0 mm. Les résultats sont repris dans le tableau 1.

Tableau 1: résultats des essais de l'exemple 2 (pb = paire de base; CV = coefficient de variance)

Plaque no.	# trous	R (mm)	# trous / R	Taille moyenne (pb)	CV (%)
1	16	30	0,53	213	9
2	18	30	0,60	265	15
3	20	30	0,67	281	16
4	22	30	0,73	451	35
5	24	35	0,69	371	20

Exemple 3 : Résultats sur plusieurs dispositifs de sonication différents

[0063] Les échantillons de sonication ont été obtenus suivant le procédé de l'exemple 1. Les microtubes ont été suspendus en utilisant la plaque de l'exemple 1 (16 microtubes aménagés sur un cercle de rayon de 30 mm), à une profondeur d'immersion de 10,3 mm.

[0064] Deux dispositifs de sonication ont été testés :

A1 : Bioruptor® Pico (Diagenode, Belgique), configuré à une fréquence de 36 kHz – 43 kHz ; et

A2 : Water bath sonicator KJ-1006 (Shenzhen Kejie Ultrasonic Technology Co., Ltd, Chine), conçu pour fonctionner à une fréquence fixe de 40 kHz.

Dans les deux cas, une sonication de 15 cycles (30 s période active/30 s période inactive) a été appliquée dans un bain d'eau distillée à 4°C. Les fragments d'ADN obtenus ont été analysés par un Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies, Inc.) et leur taille moyenne et coefficient de variance (CV) ont été calculés.

[0065] Avec le dispositif A1, des fragments de taille moyenne de 208 pb avec CV = 7% ont été obtenus. Avec le dispositif A2, des fragments de taille moyenne de 212 pb avec CV = 4,2% ont été obtenus. Les résultats sont donc comparables, ce qui indique que les conclusions obtenus ci-dessus concernant la profondeur d'immersion et la manière de suspendre des échantillons sont indépendantes du type de sonicateur à bain d'eau.

Exemple 4 : Utilisation d'une plaque de diamètre plus large

[0066] Les échantillons de sonication ont été obtenus suivant le procédé de l'exemple 1. Trente-deux (32) microtubes ont été suspendus en utilisant une plaque munie de 32 trous aménagés sur un cercle de rayon R de 45 mm ($\#trous/R = 0,71 \text{ mm}^{-1}$), à une profondeur d'immersion de 10,3 mm dans la cuve du sonicateur A2 de l'exemple 3. La même procédure de sonication que celle décrite dans l'exemple 1 a été appliquée. Les fragments d'ADN obtenus ont été analysés par un Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies, Inc.) et leur taille moyenne et coefficient de variance (CV) ont été calculés. La taille moyenne des fragments était de 212 pb et le CV de 8%.

Exemple 5 : Sonication à 20 kHz

[0067] Les échantillons de sonication ont été obtenus suivant le procédé de l'exemple 1. Les microtubes ont été suspendus utilisant la plaque de l'exemple 1 (16 microtubes aménagés sur un cercle de rayon de 30 mm), à une profondeur d'immersion de 10,3 mm dans un dispositif Bioruptor® Plus fonctionnant à une fréquence de 20 kHz.

Une sonication de 15 cycles (30 s période active/30 s période inactive) a été appliquée dans un bain d'eau distillée à 4°C. Les fragments d'ADN obtenus ont été analysés par un Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies, Inc.) et leur taille moyenne et coefficient de variance (CV) ont été calculés. Des fragments de taille moyenne de 5 2959 pb avec CV = 25% ont été obtenus. La taille moyenne est significativement plus large par rapport à une sonication à 40 kHz (voir exemple 3) en raison d'une sonication beaucoup plus efficace à 40 kHz. En augmentant le nombre de cycles (le temps de sonication), des fragments de taille plus petite pourraient être obtenus.

Revendications

1. Kit d'assemblage, comprenant un dispositif de sonication (10) et un support (20) pour tubes d'échantillon (30),
dans lequel le dispositif de sonication comprend une cuve (13) et au moins un générateur d'ondes ultrasonores (15) couplé à une face externe de la cuve, le générateur d'ondes ultrasonores étant conçu pour générer des ondes ultrasonores ayant une fréquence comprise entre 20 kHz et 80 kHz, et la cuve comprenant une indication (132) d'un niveau (133) de liquide dans la cuve,
dans lequel le support pour tubes d'échantillon comprend :
un moyen de soutien (21) de plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml,
une tige (22) ayant une extrémité inférieure et une extrémité supérieure, la tige étant solidarisée au moyen de soutien à l'extrémité inférieure,
un moyen de suspension (23) de la tige dans la cuve,
caractérisé en ce que la tige a une longueur telle qu'en position d'assemblage, les tubes d'échantillon (30) introduits dans le moyen de soutien (21) sont positionnés avec leur extrémité inférieure entre 8 mm et 12 mm en dessous de l'indication (132) du niveau de liquide.
2. Kit selon la revendication 1, comprenant lesdits plusieurs tubes d'échantillon (30) d'une taille de 0,2 ml.
3. Kit selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la tige (22) a une longueur telle qu'en position d'assemblage, les tubes d'échantillon introduits dans le moyen de soutien sont positionnés avec leur extrémité inférieure dans une plage entre 9 mm et 11,5 mm en dessous de l'indication du niveau de liquide.
4. Kit selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le moyen de soutien comprend une plaque (21) en forme de disque, la plaque comprenant plusieurs trous (211) disposés sur une circonférence d'un cercle concentrique à la tige, les trous ayant des dimensions correspondant aux tubes d'échantillon.
5. Kit selon la revendication 4, dans lequel les tubes d'échantillon comprennent un rebord (34) qui retient les tubes d'échantillon.
6. Kit selon la revendication 4 ou 5, dans lequel le support (20) comprend un moyen de serrage (25) conçu pour serrer les extrémités supérieures des tubes d'échantillon sur la plaque (21).
7. Kit selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le moyen de soutien (21) est conçu pour soutenir entre 12 et 36 tubes

d'échantillon d'une taille de 0,2 ml dans une disposition à espacement uniforme sur une circonférence d'un cercle de diamètre entre 50 mm et 100 mm, de préférence entre 60 mm et 90 mm.

- 5 **8.** Kit selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le moyen de soutien (21) est conçu pour soutenir plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml dans une disposition à espacement uniforme sur la circonférence d'un cercle, dans lequel le rapport entre le nombre de tubes d'échantillon pouvant être soutenu par le moyen de soutien et le rayon (R) du cercle et égale ou inférieur à 0,7, de préférence égale ou inférieur à 0,67.
- 10 **9.** Kit selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le moyen de suspension (23) est couplé à l'extrémité supérieure de la tige.
- 10.** Kit selon la revendication 9, dans lequel le moyen de suspension comprend une plaque (23) aménagée sur un couvercle (24) de la cuve.
- 11.** Kit selon la revendication 10, dans lequel le dispositif
- 15 comprend un actionneur (17) et la plaque du moyen de suspension est constituée d'une roue d'engrenage conçue pour faire tourner le support autour d'un axe de la tige.
- 12.** Kit selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le générateur d'ondes ultrasonores est conçu pour générer des ondes ultrasonores ayant une fréquence comprise entre 28 kHz et 80 kHz.
- 20 **13.** Support (20) pour tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml tel que décrit dans l'une quelconque des revendications précédentes et conçu pour utilisation dans le kit d'assemblage selon l'une quelconque des revendications précédentes.
- 14.** Procédé de fragmentation d'un matériel biologique, dans
- 25 lequel le matériel biologique est placé dans une solution, dans lequel la solution comprenant le matériel biologique est placée dans au moins un tube d'échantillon (30) d'une taille de 0,2 ml, le tube d'échantillon étant placé dans un bain liquide, et dans lequel des ondes ultrasonores ayant une fréquence dans la plage entre 20 kHz et 80 kHz sont amenées à traverser le bain liquide pour exciter le tube d'échantillon et la solution,
- 30 caractérisé en ce que le tube d'échantillon est positionné avec son extrémité inférieure à une profondeur (D) comprise dans la plage entre 8 mm et 12 mm du niveau (133) du bain liquide.
- 15.** Procédé selon la revendication 14, dans lequel le matériel biologique est une séquence d'ADN.

16. Procédé selon la revendication 15, dans lequel un volume d'environ 50 µl de la solution comprenant la séquence d'ADN est placé dans le tube d'échantillon.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16,
5 comprenant la rotation du tube d'échantillon autour d'un axe vertical excentrique audit tube d'échantillon.

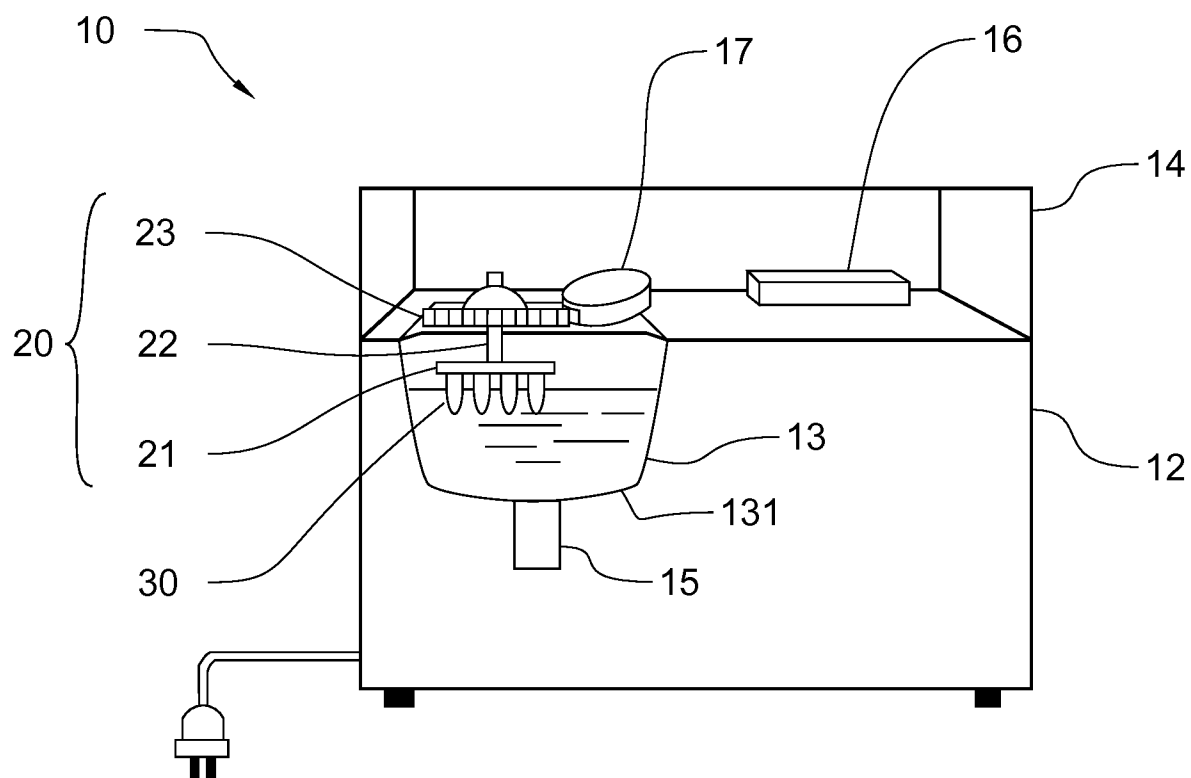


FIG 1

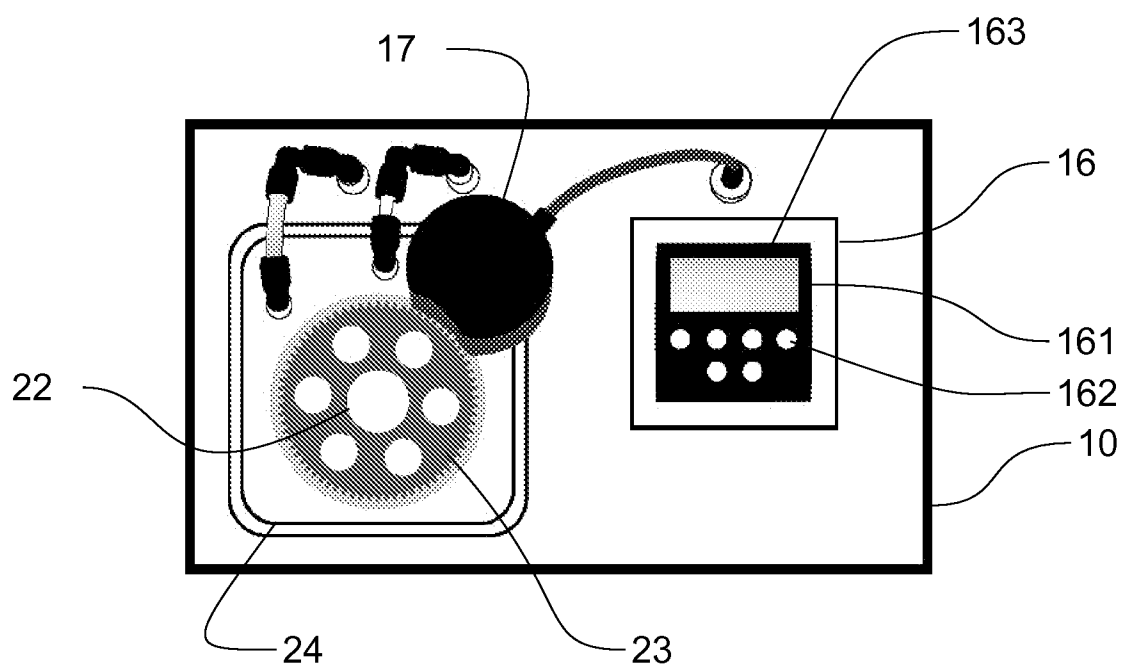


FIG 2

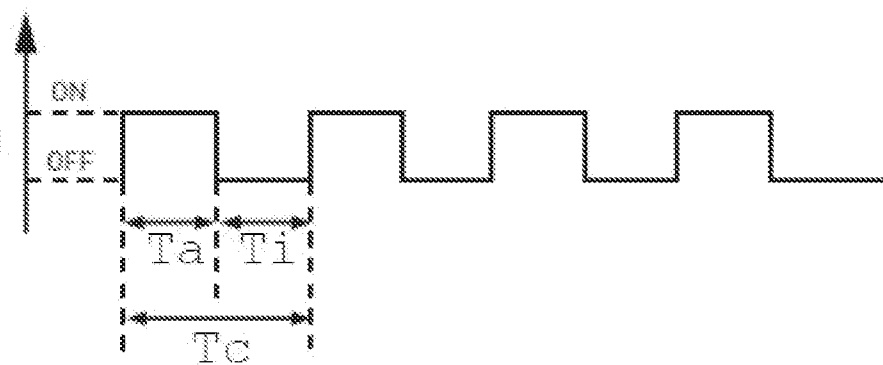


FIG 3

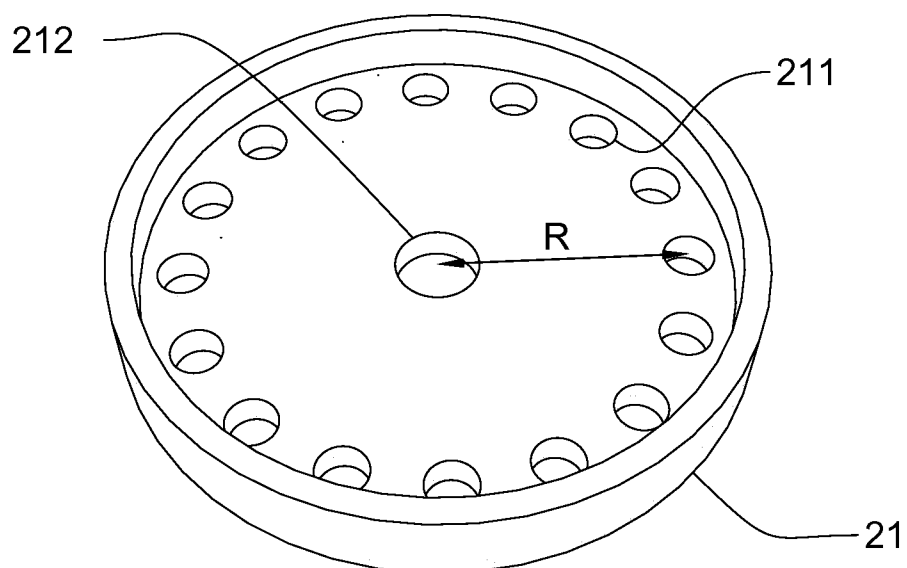


FIG 4

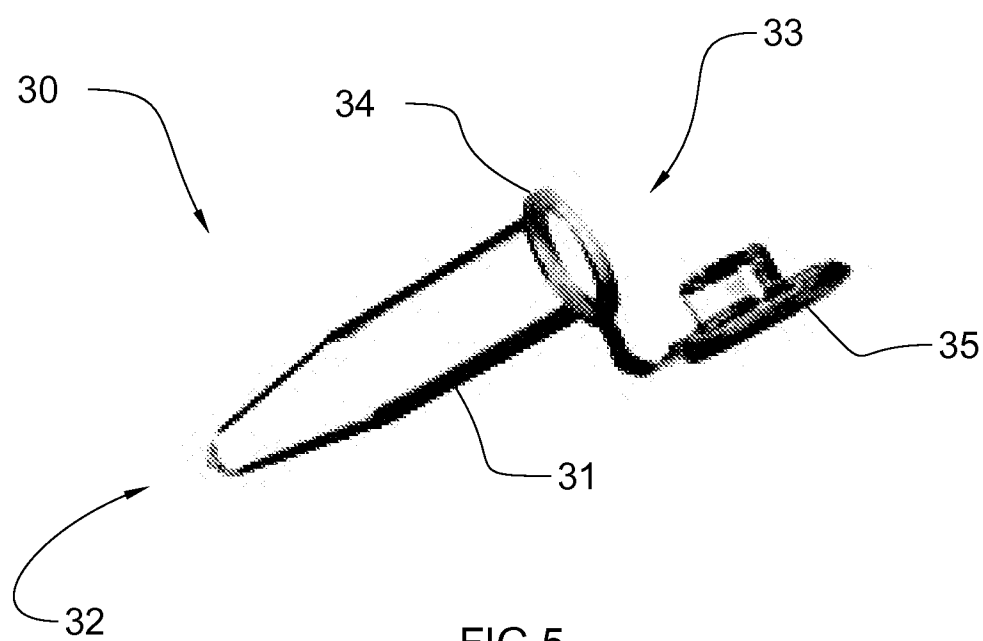


FIG 5

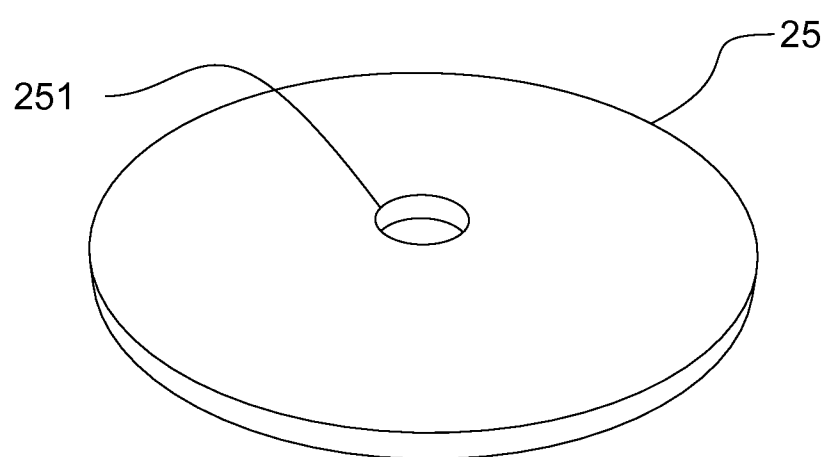
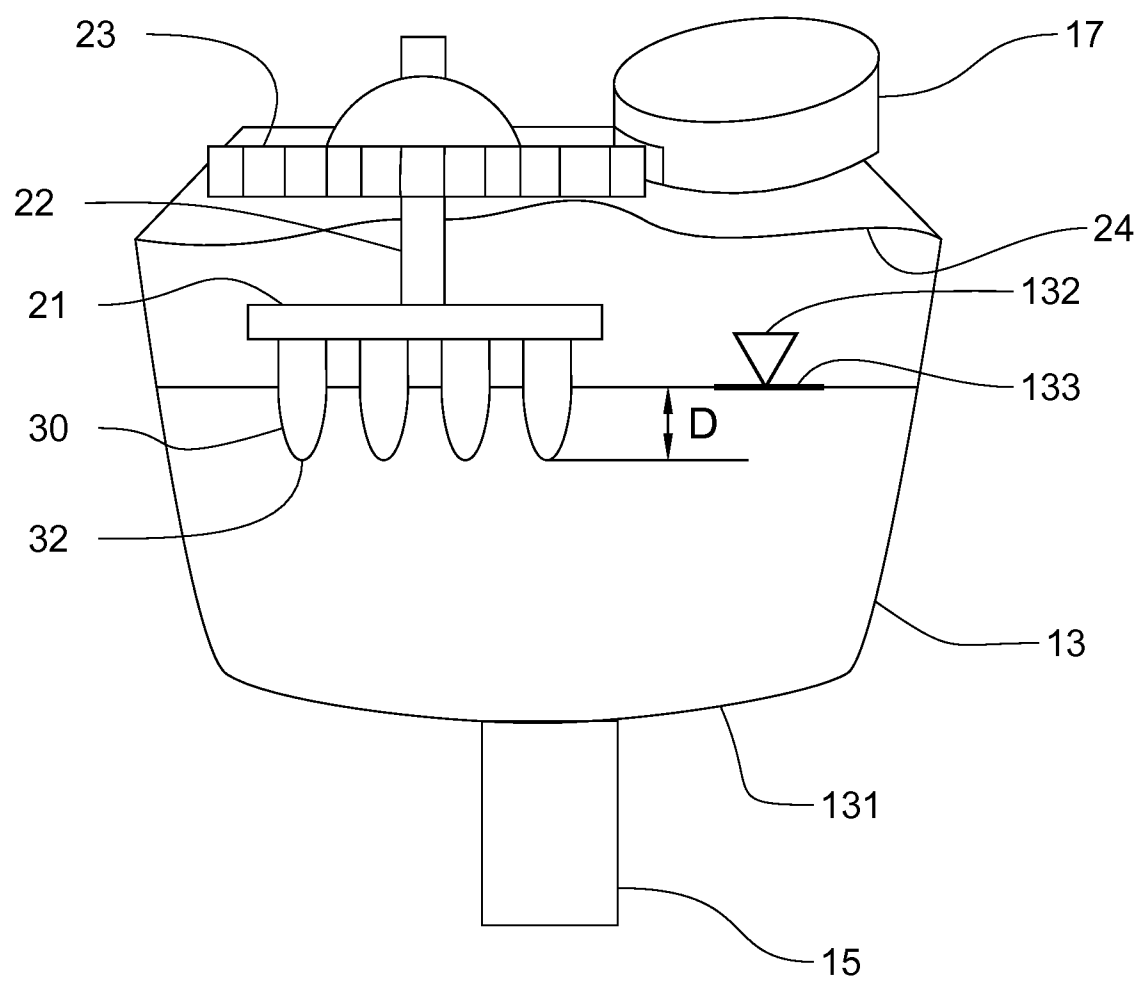


FIG 6



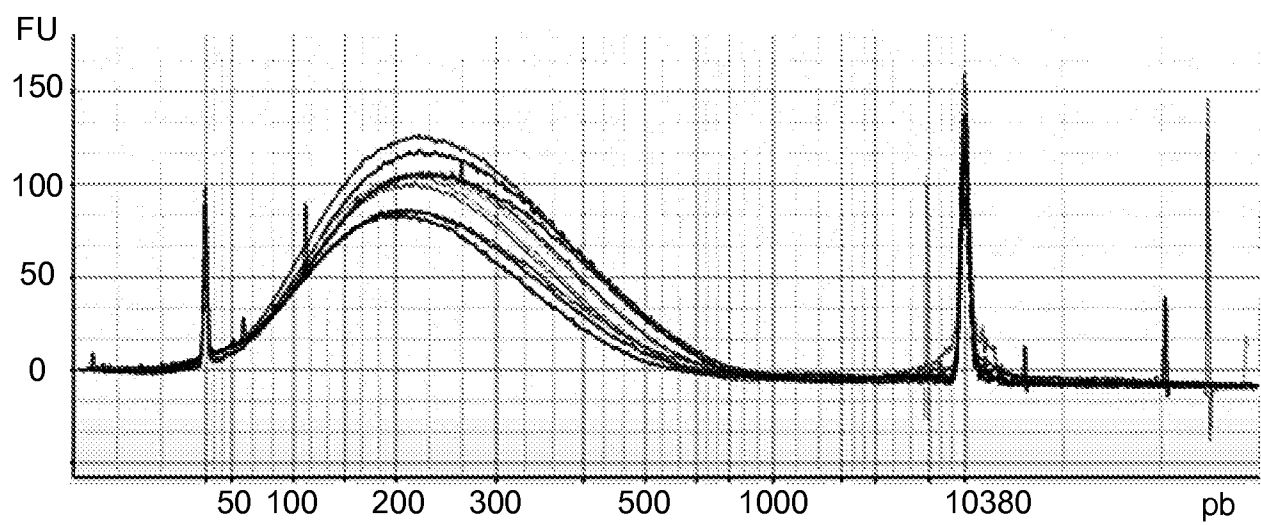


FIG 8

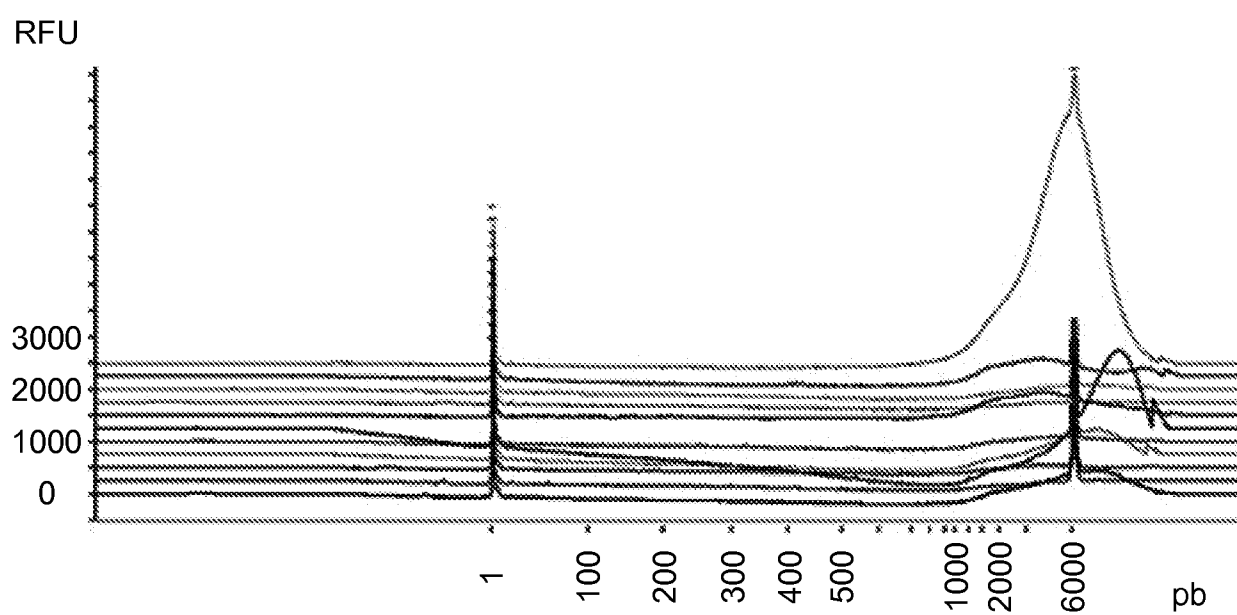


FIG 9

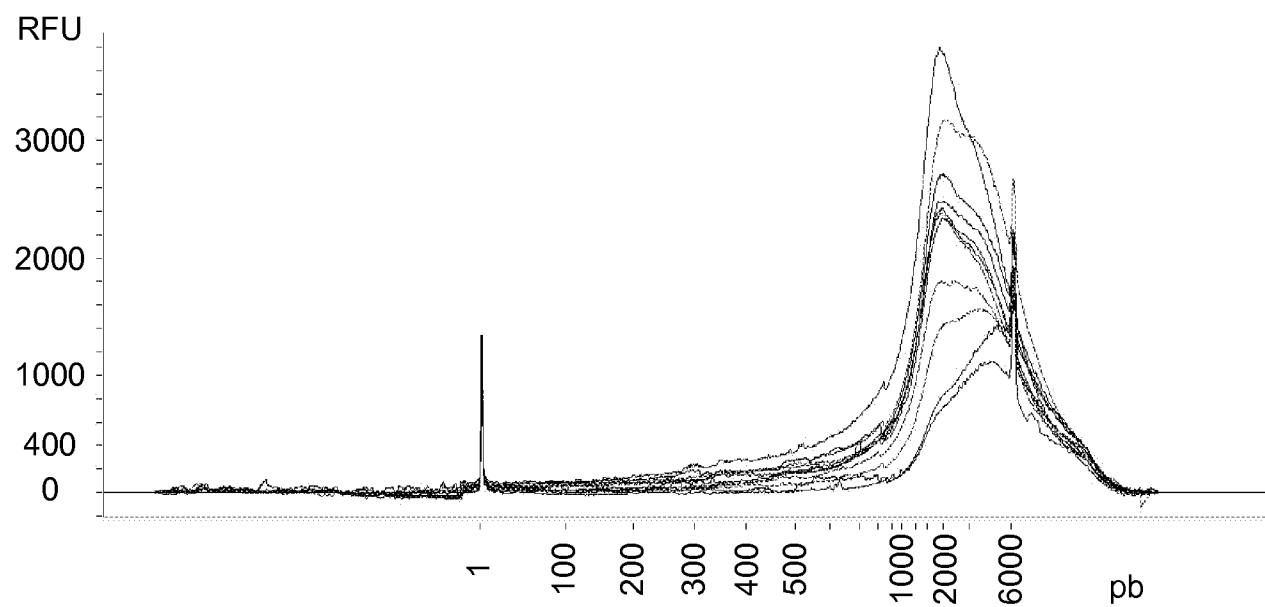


FIG 10

ABRÉGÉ**Support pour tubes d'échantillon pour la sonication d'un matériel biologique**

Kit d'assemblage, comprenant un dispositif de sonication (10) et un support (20) de tubes d'échantillon (30). Le dispositif comprend une cuve (13) et un générateur d'ondes ultrasonores (15) couplé à la cuve et conçu pour générer des ondes ultrasonores ayant une fréquence comprise entre 20 kHz et 80 kHz. La cuve comprend une indication (132) d'un niveau (133) de liquide. Le support pour tubes d'échantillon comprend un moyen de soutien (21) de plusieurs tubes d'échantillon d'une taille de 0,2 ml, une tige (22) solidarisée au moyen de soutien, et un moyen de suspension (23) de la tige dans la cuve. La tige a une longueur telle qu'en position d'assemblage, les tubes d'échantillon (30) sont positionnés avec leur extrémité inférieure entre 8 mm et 12 mm en dessous de l'indication (132) du niveau de liquide.

(FIG 1)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE	
		BPDIAG0005BE0	
Demande nationale belge n°		Date du dépôt	
201605781		18-10-2016	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom)			
DIAGENODE SA			
Date de la requête d'une recherche de type international		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international	
29-10-2016		SN67723	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B01J19/10;C12N15/10;B01L3/00;B01L9/06;B01L9/00;B06B3/00;C12Q1/68			
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
IPC		B01J;C12N;B01L;B06B;C12Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. ☐ IT A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. ☐ ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No.

BE 201605781

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV.	B01J19/10 B06B3/00	C12N15/10 C12Q1/68
	B01L3/00	B01L9/06
		B01L9/00
ADD.		
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)		
B01J C12N B01L B06B C12Q		
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 réalisable, termes de recherche utilisés)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 2 511 380 A1 (DIAGENODE S A [BE]) 17 octobre 2012 (2012-10-17) * alinéas [0023], [0034], [0039]; revendications 1-15; figure 1 * ----- -/-	13
☒ 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 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt 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 "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
14 février 2017		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Seroz, Thierry

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No.

BE 201605781

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	Anonymous: "BioruptorR Pico Sonication system: User Manual", diagenode Innovating Epigenetic Solutions ; 1 septembre 2015 (2015-09-01), pages 1-28, XP002767225, Extrait de l'Internet: URL:https://www.diagenode.com/files/products/shearing_technology/bioruptor/Bioruptor_pico_manual.pdf [extrait le 2017-02-14] * page 5, alinéas 2,3; figure 1 * * page 6 * * page 9, dernier alinéa; figure 2 * * page 16 * * pages 22,24 * -----	13

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201605781

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2511380	A1	17-10-2012	EP 2511380 A1
			US 2012264228 A1
			17-10-2012
			18-10-2012



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN67723	Date du dépôt (jour/mois/année) 18.10.2016	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE201605781
Classification internationale des brevets (CIB) INV. B01J19/10 C12N15/10 B01L3/00 B01L9/06 B01L9/00 B06B3/00 C12Q1/68			
Déposant DIAGENODE SA			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Seroz, Thierry
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201605781

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - ☐ un listage de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201605781

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-17
	Non :	Revendications	
Activité inventive	Oui :	Revendications	1-12, 14-17
	Non :	Revendications	13
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-17
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Point V

Il est fait référence au document suivant :

D1 EP 2 511 380 A1 (DIAGENODE S A [BE]) 17 octobre 2012 (2012-10-17)

Sauf indications contraires, il est fait référence aux passages déjà cités dans le rapport de recherche.

Le document D1 décrit un support pour tubes d'échantillon d'une taille comprise entre 0.1 ml et 5 ml, le volume particulièrement préféré est de 0,25 ml.

Bien que des tubes d'un volume de 0,2 ml ne soient pas expressément mentionnés dans D1, ce volume est compris dans la plage des volumes préférés de D1. De plus, le choix d'un tel volume par rapport à un volume de 0,25 ml est considéré comme purement arbitraire. En conséquence, l'objet de la **revendication 1** n'implique pas d'activité inventive au vu du document D1.

Point VIII

Au vu des résultats obtenus à l'Exemple 2, il semble évident que le rapport entre le nombre de tubes d'échantillon pouvant être soutenus par le moyen de soutien et le rayon du cercle est fondamental. En effet, il semble que ce rapport doit être inférieur ou égal à 0,7 (comme mentionné à la revendication 8) pour obtenir une taille moyenne assez basse ainsi d'un faible coefficient de variance. Il est rappelé au Demandeur qu'une revendication indépendante doit être compréhensible d'un point de vue technique mais aussi qu'elle doit définir clairement l'objet de l'invention, c'est-à-dire indiquer toutes les caractéristiques techniques essentielles dudit objet de l'invention. La **revendication 1** ne comprend donc pas la totalité des caractéristiques essentielles de l'invention. La même objection est soulevée contre la **revendication 14**.