

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2023/111452 A1

(43) Date de la publication internationale
22 juin 2023 (22.06.2023)

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/6825 (2018.01) C12Q 1/6874 (2018.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2022/052345

(22) Date de dépôt international :
14 décembre 2022 (14.12.2022)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR2113618 16 décembre 2021 (16.12.2021) FR

(71) Déposant : COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES
[FR/FR] ; 25 rue Leblanc Bât le Ponant, 75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs : ALAVA, Thomas ; CEA GRENOBLE, 17
rue des Martyrs, 38054 GRENOBLE CEDEX 09 (FR).
AIME, Jean-Pierre ; 21 rue des Menuts, 33000 BOR-
DEAUX (FR). HENTZ, Sébastien ; CEA GRENOBLE, 17
rue des Martyrs, 38054 GRENOBLE CEDEX 09 (FR). B-
HURTH, Cédric ; 131 Tonge Road, ME10 3NX, Sitting-
bourne, Kent (GB).

(74) Mandataire : BREVALEX ; Tour TRINITY, 1 BIS ES-
PLANADE DE LA DEFENSE, CS 60347, 92035 PARIS
LA DEFENSE CEDEX (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, CV, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: DEVICE FOR SEQUENCING A NUCLEOTIDE SEQUENCE EXHIBITING INCREASED SENSITIVITY AND IMPROVED RELIABILITY

(54) Titre : DISPOSITIF DE SÉQUENÇAGE D'UNE SEQUENCE DE NUCLEOTIDES PRÉSENTANT UNE SENSIBILITÉ AUGMENTÉE ET UNE FIABILITÉ AMÉLIORÉE

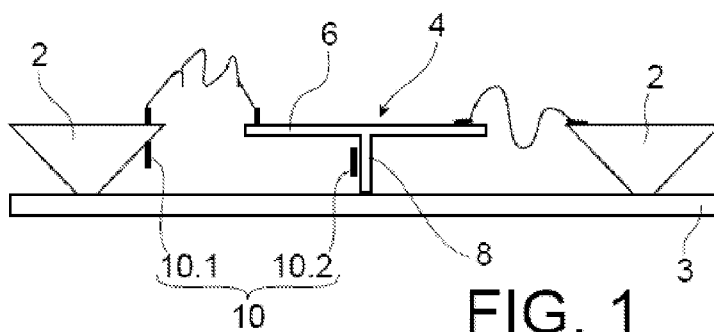


FIG. 1

(57) Abstract: A device for sequencing at least one nucleotide strand, comprising a support (3), at least one part (4) which is mobile relative to the support (3), means for vibrating the mobile part (4) at a given frequency, means for measuring the frequency of vibration of the mobile part (4), and a recognition probe (SR) mechanically connecting the support and the mobile part (4), the recognition probe (SR) comprising at least one nucleotide sequence.

(57) Abrégé : Dispositif de séquençage d'au moins un brin de nucléotides comportant un support (3), au moins une partie mobile (4) par rapport au support (3), des moyens de mise en vibration de la partie mobile (4) à une fréquence donnée, des moyens de mesure de la fréquence de vibration de la partie mobile (4), une sonde de reconnaissance (SR) reliant mécaniquement le support et la partie mobile (4), la sonde de reconnaissance (SR) comportant au moins une séquence de nucléotides.



WO 2023/111452 A1

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

DESCRIPTION**Titre : DISPOSITIF DE SÉQUENÇAGE D'UNE SEQUENCE DE NUCLEOTIDES PRÉSENTANT
UNE SENSIBILITÉ AUGMENTÉE ET UNE FIABILITÉ AMÉLIORÉE****DOMAINE TECHNIQUE ET ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE**

La présente invention se rapporte à un dispositif de détection d'au moins une séquence de nucléotides et à un système de détection comportant un grand nombre de tels dispositifs.

Un dispositif de séquençage ou séquenceur a pour objectif de déterminer la composition exacte d'une séquence de bases nucléiques ou nucléo-bases sur un brin d'ADN ou d'ARN analysé. Cette détermination peut être réalisée en identifiant la séquence par interaction avec une sonde formée par un brin. Cette interaction se traduit par une réaction d'hybridation entre le brin analysé et le brin sonde. Le brin analysé se lie avec une plus grande facilité à une sonde dont la séquence correspond exactement à la séquence complémentaire du brin analysé, et avec moins de facilité à une sonde dont la séquence est différente de sa séquence complémentaire.

Les méthodes de l'état de la technique présentent un manque de sensibilité en provoquant un grand nombre de faux positifs, i.e. provoquent l'appariement de deux brins alors qu'ils ne sont pas complémentaires par leurs séquences.

Une méthode pour réduire le nombre de faux positifs est de réduire la longueur des brins analysés, or cette réduction a pour effet d'augmenter la durée et le coût de l'analyse de la séquence totale.

Une autre méthode consiste à augmenter le nombre de capteurs munis de la même sonde de reconnaissance afin de réaliser la même analyse, permettant statistiquement de réduire le nombre de faux positifs. Cette méthode requiert un volume d'échantillon important

Par ailleurs il existe une forte demande pour fournir des dispositifs de séquençage d'ADN.

En particulier, des méthodes rapides et avec des taux d'erreurs réduits.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

C'est par conséquent un but de la présente invention d'offrir un dispositif de détection pour le séquençage d'au moins un fragment d'ADN ou d'ARN, plus sensible et plus fiable que les dispositifs de l'état de la technique.

5 Plus généralement, la présente invention concerne un dispositif de détection de bases nucléiques ou nucléo-bases.

Le but énoncé ci-dessus peut être atteint par un dispositif, de détection ou de séquençage, comportant au moins une partie fixe et une partie configurée pour être mise en vibration par rapport à la partie fixe, une sonde oligonucléotide reliant
10 mécaniquement la partie fixe et la partie mobile, des moyens pour mettre en vibration la partie mobile et des moyens pour mesurer la fréquence de vibration de la partie mobile avant et après hybridation du brin analysé sur la sonde.

Le niveau d'hybridation entre la sonde et le brin analysé fait varier la raideur de l'ensemble sonde et brin analysé, ce qui a une influence sur la fréquence mécanique de
15 résonance de la partie vibrante. On détecte ainsi ce niveau d'hybridation.

En fonction de la variation de la fréquence de résonance mécanique, il peut être déterminé si l'hybridation est totale, partielle ou nulle et ainsi en déduire la séquence exacte de nucléobases du brin analysé.

En d'autres termes, on mesure la raideur mécanique d'un ensemble composé d'un brin analysé et d'une séquence de nucléotides, cette raideur étant caractéristique du niveau
20 d'appariement du brin analysé et de la séquence, ce qui permet d'en déduire la structure du brin en cas d'appariement complet.

Avantageusement la partie mobile est un anneau optomécanique résonant.

Le dispositif peut être intégré dans un canal fluide dans lequel un fluide comportant
25 les brins analysés circule de sorte à entrer en contact avec la sonde.

De manière préférée, on réalise un système comportant un grand nombre de dispositifs de détection de bases nucléiques ou nucléo-bases ou de séquençage permettant par exemple d'analyser un génome complet en une seule mesure.

Selon un aspect, la présente invention concerne un dispositif de détection et/ou de
30 séquençage d'au moins un brin de nucléotides comportant un support, au moins une

partie mobile par rapport au support, des moyens de mise en vibration de la partie mobile à une fréquence donnée, des moyens de mesure de la fréquence de vibration de la partie mobile, une sonde de reconnaissance reliant mécaniquement le support et la partie mobile, la sonde de reconnaissance comportant au moins une séquence de

5 nucléotides.

Avantageusement, les moyens de mise en vibration de la partie mobile sont configurés pour mettre en vibration la partie mobile à sa fréquence de résonance.

Selon une possibilité de mise en œuvre, les moyens de mesure de la fréquence de vibration sont des moyens opto-mécaniques.

10 Selon un mode de réalisation, les moyens de mesure de la fréquence de vibration comportent au moins un guide d'onde couplé optiquement avec la partie mobile, une source de lumière pour injecter de la lumière dans le guide d'onde et une unité de traitement de la lumière sortant du guide d'onde.

Avantageusement, la partie mobile peut être sous forme d'un disque, d'un anneau, d'un

15 hippodrome ou une ellipse suspendu(e) par au moins un pied.

Selon une possibilité de mise en œuvre, le dispositif peut comporter plusieurs sondes identiques reliant la partie mobile au support.

Le support peut comporter un premier précurseur d'adaptateur et un premier adaptateur dont une extrémité est fixée au premier précurseur d'adaptateur et l'autre extrémité

20 comporte une séquence de nucléotides hybridée avec une extrémité de la sonde de reconnaissance, et dans lequel la partie mobile comporte un deuxième précurseur d'adaptateur et un deuxième adaptateur comprenant une sonde dont une extrémité est fixée au deuxième précurseur d'adaptateur et l'autre extrémité comporte une séquence de nucléotides hybridée avec une extrémité de la sonde de reconnaissance.

25 La présente invention concerne également un ensemble comportant le dispositif tel que défini précédemment ainsi qu'un canal fluide assurant la mise en contact d'un liquide contenant ledit brin analysé et de la sonde de reconnaissance.

La présente invention concerne également un système comportant une pluralité de dispositifs de séquençage tels que définis précédemment.

Avantageusement, les dispositifs sont répartis en groupe, chaque groupe comportant des sondes de reconnaissance ayant la même structure de nucléotides.

Avantageusement, les sondes de reconnaissance sont choisies de sorte qu'en une seule mesure un génome complet est analysé.

5 Pour cela, on prévoit typiquement des centaines de milliers de capteurs en parallèles et/ou plusieurs cycles de mesures.

La présente invention concerne également un procédé de détection de bases nucléiques ou nucléo-bases ou de séquençage d'au moins une séquence de nucléotides comportant :

10 - la mise en contact d'un liquide contenant ladite séquence avec un dispositif résonant comportant une sonde de reconnaissance reliant une partie fixe et une partie mobile du dispositif résonant,

- la mise en vibration de la partie mobile,

- la mesure de la variation de la fréquence de vibration de la partie mobile du à l'hybridation entre la sonde de reconnaissance et la séquence de nucléotides.

15 Avantageusement, la partie mobile est mise en vibration à sa fréquence de résonance.

Typiquement, la partie mobile peut être mise en vibration avec une amplitude de l'ordre de 0,1 nm.

Selon un mode de réalisation, la partie mobile est mise en vibration à une fréquence comprise entre 100 MHz et

20 1 GHz.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

La présente invention sera mieux comprise sur la base de la description qui va suivre et des dessins en annexe sur lesquels :

25 Figure 1 est une vue de côté d'un exemple de réalisation d'un dispositif suivant l'invention,

Figure 2 est une vue du dispositif de la figure 1 dans un état dans lequel un brin analysé est hybridé sur la sonde,

Figure 3B est une vue de détail du dispositif de la figure 1,

Figure 3A est une vue de détail du dispositif de la figure 1 sans sonde d'accrochage,

30 Figure 4 est une vue de détail d'une variante du dispositif de la figure 1,

Figure 5 est une représentation schématique du dispositif de la figure 1 intégré dans un canal fluïdique,

Figure 6 est une représentation d'un dispositif tel que mis en œuvre suivant un mode de réalisation et mettant en œuvre des moyens de détection opto-mécaniques,

5 Figure 7 est une vue de dessus d'un système comprenant un réseau de dispositifs de détection,

Figure 8A-8B, 9A-9B, 10A-10B servent à illustrer le fonctionnement d'un exemple de dispositif de détection de bases nucléïques ou nucléo-bases d'un brin d'ADN ou d'ARN et plus particulièrement à une détection du niveau d'hybridation entre une sonde de reconnaissance et ce brin.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

Sur la figure 1, on peut voir un exemple de réalisation d'un dispositif de détection.

L'invention s'applique à la détermination de fragments d'ADN et de fragments d'ARN, et peut trouver application dans le séquençage de génomes.

15 Le séquençage de l'ADN ou de l'ARN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné ou d'un fragment d'ARN donné respectivement.

Sur les figures 1, 2 et 3A et 3B, on peut voir un exemple d'un dispositif comportant au moins une partie fixe 2, deux dans l'exemple représenté, par exemple solidaire d'un support 3 et une partie 4, désignée partie mobile, destinée à être mobile par rapport à la partie fixe 2 dans le plan du dispositif. La partie fixe 2 est disposée à proximité de la partie mobile 4. La distance entre le bord de la partie fixe 2 et le bord en regard de la partie mobile 4 est par exemple comprise entre 100 nm et 200 nm. Cette distance est choisie de sorte à éviter tout contact entre la partie mobile et la partie fixe dans des conditions normales d'oscillation de la partie mobile.

Le plan du dispositif ou du capteur est le plan parallèle au support 3, généralement formé par un substrat mis en œuvre en micro-électromécanique.

Dans l'exemple représenté la partie mobile comporte une plateforme 6 suspendue par un pied 8. Les dimensions du pied et de la plateforme 6 sont telles que la plateforme 6 peut osciller sensiblement dans le plan.

Le dispositif est un dispositif résonant et comporte des moyens d'excitation 10 pour mettre en vibration la partie mobile 4 dans le plan. Dans l'exemple représenté de manière schématique sur la figure 1, les moyens d'excitation sont de type électrostatique et comportent une électrode 10.1 sur la partie fixe et une électrode 10.2 sur la partie mobile formée par le pied directement. L'application d'une différence de potentiels entre les électrodes génère des forces électrostatiques entre le pied et la partie fixe mettant en vibration la plateforme. La mise en œuvre de moyens d'excitation au niveau du pied permet de limiter l'encombrement.

En variante, il est également possible d'utiliser des moyens d'excitation optiques. On utilise en particulier des forces de radiation ou thermo-optiques. Dans les deux cas, il s'agit d'utiliser un laser de longueur d'onde dans un pic optique, mais dont la puissance est modulée à la fréquence d'intérêt, en l'occurrence celle de la résonance mécanique du dispositif. Ce laser peut être le même que celui utilisé pour la lecture optique, ou un autre laser, par exemple que l'on vient superposer au premier.

Le dispositif comporte également des moyens de mesure (non représentés) de la fréquence de vibration de la partie mobile. La partie mobile forme alors un résonateur mécanique. Ces moyens comportent par exemple un ou plusieurs transducteurs capacitifs, piézo-résistifs, opto-mécaniques, à ondes acoustiques de type à onde acoustique de volume BAW (« Bulk Acoustic Wave » en terminologie anglo-saxonne) ou de type à onde acoustique de surface SAW (« Surface Acoustic Wave » en terminologie anglo-saxonne).

La partie mobile 4 peut être une poutre encastree par une extrémité et mise en vibration par des moyens électrostatiques et dont la fréquence est mesurée par des jauges piézorésistives.

Selon un autre exemple, la partie mobile 4 peut être une plaque vibrante dans un mode de Lamé ou de respiration.

Un exemple de détection opto-mécanique sera décrit en détail.

De préférence la partie mobile est excitée à une fréquence de résonance permettant une amplification maximale du signal d'entrée et un maximum de sensibilité de la réponse du dispositif à une perturbation (modification de l'environnement).

Le résonateur est choisi de préférence de sorte à présenter un amortissement visqueux réduit. En effet, le dispositif est destiné à être disposé dans un canal fluide dans lequel s'écoule un liquide contenant le ou les brins analysés.

Sur la figure 3B, on peut voir une vue agrandie du dispositif de la figure 1. La figure 3A
5 représente le dispositif avant la fixation d'une sonde de reconnaissance SR.

Le dispositif comporte une sonde de reconnaissance SR destinée à s'hybrider avec le brin analysé. La sonde de reconnaissance est par exemple une sonde oligonucléotide. La sonde peut comporter par exemple entre une centaine et plusieurs milliers de nucléotides.

10 Le dispositif comporte également des séquences de nucléotides 12, 14 l'une fixée par une extrémité à la partie fixe 2 et l'autre fixée par une extrémité à la partie mobile 4. Les deux extrémités libres des séquences de nucléotides 12, 14 sont destinées à s'accrocher aux extrémités de la sonde de reconnaissance SR par hybridation et permettre à la sonde de reconnaissance SR de relier mécaniquement la partie fixe 2 et la
15 partie mobile 4.

Les séquences 12, 14 sont désignés « adaptateurs » et comportent les séquences complémentaires aux extrémités de la sonde de reconnaissance, ce qui permet l'hybridation des deux extrémités de la sonde de reconnaissance sur les adaptateurs. Une fois accrochés aux adaptateurs 12, 14 la sonde de reconnaissance SR comporte une
20 succession de nucléotides libres désignée « zone utile » et destinée à coopérer par hybridation avec le brin analysé.

La partie fixe comporte sur sa face supérieure une couche 16 permettant l'accroche de l'adaptateur 12 et la face supérieure de la partie mobile comporte une couche 18 permettant l'accroche de l'adaptateur 14. Les couches 16, 18 sont dites des « précurseurs
25 d'adaptateur » et comportent par exemple du silane ou une fine couche métallique. Un adaptateur ADN-thiol sur une couche d'accroche en or peut être prévu. Un ou plusieurs thiols, du polyéthylène glycol PEG, de l'époxyde peuvent être également utilisés pour le précurseur d'adaptateur. Il existe par ailleurs une forte affinité entre la biotine et la streptavidine, ainsi, l'un de ces deux éléments peut correspondre à un précurseur

d'adaptateur tandis que l'autre peut être prévu à une extrémité de l'adaptateur 12, 14 permettant ainsi « d'attacher » l'adaptateur sur la partie fixe ou mobile.

De préférence, préalablement au dépôt des précurseurs d'adaptateur, la face supérieure de la partie fixe et de la partie mobile présentent des fonctionnalisations différentes pour être sélectives par rapport aux précurseurs d'adaptateur. La fonctionnalisation est par exemple obtenue par formation d'un film 17, sur la face supérieure de la partie fixe et d'un film 19 en matériau différent sur la face supérieure de la partie mobile. Les films 17, 19 peuvent être par exemple en matériau polymère ou en matériau métallique tel que de l'or. Un exemple de réalisation particulier prévoit :

- un film 17 en SiO₂, et une couche 16 en PLL-g-PEG ou silane
- un film 19 en or avec une couche 18 à base de thiol.

Typiquement, les films 17, 19 ont une épaisseur de l'ordre de 100 nm.

De manière préférée, les zones fonctionnalisées sont situées aux endroits les plus sensibles mécaniquement, i.e. qui présentent le déplacement le plus important, par exemple le bord de la partie mobile et/ou en vis-à-vis de la partie fixe.

Les adaptateurs sont donc choisis en fonction de la sonde de reconnaissance à disposer entre la partie fixe et la partie mobile et donc en fonction du brin analysé.

Avantageusement, le dispositif comporte plusieurs parties fixes et plusieurs sondes de reconnaissance reliant les parties fixes à la partie mobile, les sondes comportant les mêmes séquences de nucléotides. Les parties fixes peuvent être d'un seul tenant et par exemple formées d'un anneau autour de la partie mobile. En augmentant le nombre de sondes de reconnaissance, on augmente la probabilité d'accroche du ou des brins analysés, ce qui augmente la sensibilité du dispositif.

Sur la figure 5, on peut voir une représentation schématique d'un ensemble comportant le dispositif des figures 1 et 2 intégré dans un canal fluide C, par exemple formé par coopération entre un capot 21 et le support 3 du dispositif. La circulation du liquide contenant les brins à analyser est en circuit ouvert ou en circuit continu. En circuit ouvert, le canal est connecté à un réservoir contenant le liquide et les brins à analyser et à une zone de collecte du liquide après circulation dans le canal. Une pompe de circulation peut être prévue.

En circuit fermé, le liquide est par exemple injecté dans le canal par une seringue et une pompe assure la recirculation du liquide dans le canal. Le fonctionnement en boucle fermée permet de recycler les produits et de réaliser plusieurs mesures. On peut prévoir de réinitialiser les capteurs en mettant en œuvre une fonte thermique des brins ADN appariés. On peut également prévoir d'accumuler des données de mesure sans effectuer de chauffage intermédiaire entre les cycles consécutifs de mesure en faisant circuler plusieurs fois le fluide sur le ou les dispositifs.

Le fonctionnement de ce dispositif va maintenant être décrit.

La partie mobile 4 reliée à la partie fixe 2 par l'ensemble « adaptateur – sonde de reconnaissance – adaptateur » est mise en vibration par les moyens d'excitation.

L'amplitude de la vibration de l'ordre d'une distance interatomique, environ 0,1 nm (1 Angström). L'ensemble « adaptateur – sonde de reconnaissance – adaptateur » présente une certaine raideur et dissipe une certaine quantité d'énergie. La partie mobile oscille dans le plan à une fréquence donnée typiquement entre une 100 kHz et 1 GHz, préférentiellement entre 1 MHz et une ou plusieurs dizaines de MHz qui résulte des moyens d'excitation, de la raideur de l'ensemble « adaptateur – sonde de reconnaissance – adaptateur » et de sa dissipation.

Un liquide contenant le brin ADN ou ARN analysé circule sur le dispositif séquenceur.

Celui-ci entre en contact avec au moins la partie de la sonde de reconnaissance SR non hybridée avec les adaptateurs. Le brin analysé s'hybride de manière plus ou moins

complète avec la sonde d'accrochage (figure 2). Plus le niveau d'hybridation est élevé, plus la raideur de l'ensemble « adaptateur – sonde de reconnaissance – adaptateur » et brin analysé augmente et plus l'ensemble sonde-brin couple la partie fixe à la partie mobile ce qui a pour effet de modifier la fréquence d'oscillation de la partie mobile. Les moyens de mesure mesurent cette fréquence de vibration qui a varié par rapport à sa fréquence de vibration avant l'hybridation du brin analysé. La fréquence peut varier d'une à plusieurs centaines de Hertz.

En effet, lorsque le brin analysé s'hybride avec la sonde de reconnaissance, les deux brins se contractent et l'ensemble ainsi formé présente une raideur longitudinale déterminée et connue, plus grande que celle de la sonde de reconnaissance seule. La grande

sensibilité de mesure, au nucléotide près, SNP (pour « single-nucleotide polymorphism », i.e. polymorphisme d'un seul nucléotide), peut être proposée dans la mise en œuvre d'une compétition cinétique de type déplacement de brins. Le dispositif présente donc une grande fiabilité, une grande sensibilité et une vitesse de détection élevée.

5 La mesure de l'énergie dissipée est une source d'information riche sur le processus d'hybridation.

Dans le cas où aucune hybridation n'a lieu entre le brin analysé et la sonde d'accrochage, la fréquence de vibration de la partie mobile ne varie pas ou pas significativement, en particulier moins de 0.001% de variation ce qui correspond par exemple à moins de 300

10 Hz de variation pour une fréquence de résonance initiale de 30MHz.

La grande sensibilité des moyens de détection permet de détecter le niveau d'hybridation entre le brin et la sonde de reconnaissance. Le fait que le dispositif permette de détecter et mesurer les états intermédiaires d'hybridation (hybridation partielle), permet néanmoins d'obtenir des informations sélectives sur les différentes séquences.

15 Ce dispositif permet une grande fiabilité de détection.

En outre, le dispositif séquenceur permet l'analyse de longues séquences des nucléotides, ce qui permet de réduire le temps d'analyse. Par exemple, on prévoit de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ paires de bases pour analyser une bactérie.

De manière avantageuse, le fait de solliciter mécaniquement le brin hybridé permet de
20 vérifier l'hybridation. Si le brin est partiellement hybridé, l'hybridation sera moins résistante à une sollicitation mécanique axiale. La sollicitation axiale permet alors de réduire sensiblement le risque de faux positifs.

Le procédé de détection de niveau d'hybridation peut alors se dérouler selon les étapes suivantes :

- 25
- Mise en vibration du résonateur à une fréquence donnée, de préférence sa fréquence de résonance mécanique,
 - Circulation d'une solution contenant le brin à analyser sur le dispositif,
 - Mesure de la fréquence de vibration du résonateur,
 - Détection d'une hybridation parfaite, partielle ou d'aucune hybridation.
- 30 - S'il y a hybridation parfaite, la séquence du brin analysé est alors connue.

De préférence, lors de l'hybridation le liquide circule.

La vitesse de circulation du liquide est de préférence limitée, par exemple à un débit de l'ordre de un ou plusieurs ml/min. L'hybridation peut durer de l'ordre de plusieurs minutes, par exemple 5 minutes.

5 On peut jouer sur la vitesse de flux, la répétition de mesures avec les cycles, effectuer des paliers. La circulation de liquide est arrêtée et la mesure s'effectue par accumulation des données avec une probabilité d'accrochage contrôlée par la diffusion des cibles [Note : une option supplémentaire qui permet différents types de mesure sans la perturbation du flux].

10 Sur la figure 6, on peut voir un exemple de réalisation dans lequel les moyens de détection sont des moyens opto-mécaniques.

Le dispositif comporte un résonateur optique 4, au moins un guide d'onde 20 couplé optiquement avec le résonateur, le guide d'onde étant supporté par le substrat, une source lumineuse SL et des moyens de traitement T de l'onde lumineuse sortant du guide
15 d'onde. Le support, le guide d'onde, le résonateur opto-mécanique forme une structure de capteur.

Le guide d'onde 20 comporte une extrémité d'entrée 20.1 d'une onde lumineuse connectée à une source lumineuse par l'intermédiaire d'un réseau de couplage 22.1 non représenté sur la figure, et une extrémité de sortie 20.2 connectée à des moyens de
20 traitement de l'onde lumineuse sortant du guide d'onde par l'intermédiaire d'un réseau de couplage 20.2.

Le résonateur 4 est disposé à proximité d'un flanc du guide d'onde 20 de sorte à être couplé optiquement à celui-ci. Le guide d'onde 20 est dans le champ évanescent du résonateur, de sorte que l'onde lumineuse provenant de la source SL soit injectée dans le
25 résonateur optique et que l'onde lumineuse ayant circulé dans le résonateur soit collectée par le guide d'onde. L'onde circulant dans le résonateur est symbolisée par une flèche.

La largeur de l'espace entre le flanc du guide d'onde et le bord latéral du résonateur est par exemple comprise entre 10 nm et 50 nm.

Dans l'exemple représenté le résonateur optomécanique 4 a la forme d'un disque suspendu à un pied 24 fixé à une face du disque en regard du substrat. Le disque s'étend dans un plan du capteur. Le résonateur comporte deux faces d'extrémité 4.1, 4.2 sensiblement parallèles au plan du capteur et une face latérale 6.3 (figure 6).

5 De préférence le pied présente un diamètre faible par rapport aux dimensions du disque dans le plan du capteur, plus particulièrement un diamètre faible par rapport au diamètre du disque, de préférence le pied présente un diamètre au moins 10 fois plus petit que le diamètre du disque.

10 Plus généralement, le diamètre du pied est dix fois plus petit que la plus petite dimension du résonateur dans le plan du capteur, ainsi le pied gêne peu ou pas la vibration radiale du résonateur.

En variante, le résonateur est suspendu par des ressorts dans le plan ou par des poutres de taille nanométriques s'étendant radialement et comprimées et tendues par la vibration du disque. Les ressorts ou les poutres sont alors dimensionnés pour présenter
15 une raideur axiale plus faible que celle du résonateur.

Toute autre forme de résonateur peut convenir, par exemple vue de dessus le résonateur peut avoir une forme d'anneau, d'ellipse ou hippodrome (« racetrack » en terminologie anglo-saxonne). Dans le cas d'un résonateur en forme d'anneau, d'ellipse ou hippodrome, celui-ci est suspendu au substrat par exemple au moyen d'un pied situé au centre du
20 résonateur, et de poutres s'étendant entre le bord intérieur du résonateur et le pied.

Le résonateur peut être réalisé en tout matériau capable de confiner une onde électromagnétique, tel que le GaAS, le Ge ou le Si. Ce dernier est particulièrement intéressant pour une fabrication selon les techniques microélectroniques offrant un
niveau élevé d'intégration sur un substrat.

25 La couche de fonctionnalisation est formée par exemple sur la face 4.2 du résonateur opposée à celle 4.1 en regard du substrat.

Les moyens d'excitation sont par exemple des moyens électrostatiques (non représentés) ou des moyens optiques.

Le fonctionnement du capteur va maintenant être décrit.

De préférence, on choisit la longueur d'onde de l'onde lumineuse à injecter dans le résonateur proche de la résonance optique du résonateur, i.e. à flanc du pic de résonance optique. La lumière résonant à l'intérieur du résonateur optique est alors très sensible à la déformation mécanique du résonateur mécanique, en particulier lorsque le résonateur optique et mécanique sont confondus.

L'onde lumineuse à la longueur d'onde choisie est injectée dans le guide d'onde par la source lumineuse, par couplage optique l'onde lumineuse est injectée dans le résonateur optomécanique 4.

Lorsque d'un brin analysé s'hybride sur la sonde de reconnaissance, en fonction du niveau d'hybridation la raideur de la liaison entre le résonateur et la partie fixe est modifiée et l'énergie dissipée également, ce qui a un effet sur la fréquence de vibration du résonateur, qui en général augmente.

En effet, la fréquence mécanique

$$f = \sqrt{\frac{\text{raideur}}{\text{masse}}}$$

La masse du résonateur ne varie quasiment pas lors de l'hybridation, par conséquent lorsque la raideur du résonateur augmente, sa fréquence augmente.

La mesure de la variation de la fréquence de vibration, permet de déterminer si l'hybridation a été totale ou non, et si l'hybridation a été totale, de déterminer l'identité du brin analysé. En effet le résonateur optomécanique est suffisamment sensible pour distinguer entre un appariement parfait ou quasi-parfait.

En variante, la mesure de variation de la fréquence de vibration peut être combinée à une mesure des variations des propriétés optiques du résonateur permettant d'acquérir des informations complémentaires.

Le résonateur optomécanique a par exemple une fréquence de vibration entre 100 MHz et 1 GHz avec des oscillations d'amplitude de l'ordre de quelques picomètres. Le fait de travailler à hautes fréquences permet d'augmenter la sensibilité de détection et la précision des données recueillies en particulier par un niveau d'échantillonnage temporel jamais atteint jusqu'à présent.

Le résonateur optomécanique tel que décrit ci-dessus offre en outre l'avantage d'offrir de très bonnes performances en milieu liquide.

De manière préférée, on réalise un système comprenant un grand nombre de dispositifs de détection D (figure 7). Par exemple, on peut prévoir entre 9 et de l'ordre de 10000

5 résonateurs. Un nombre encore plus élevé de résonateurs peut être prévu, la limite pouvant être définie en fonction du coût de fabrication.

Chaque dispositif ou chaque groupe de dispositifs peut être muni de sondes de reconnaissance différentes. Chaque détecteur délivre son propre signal qui est traité par une unité de traitement. Seule une partie des dispositifs est schématisée.

10 Le système comporte par exemple un canal fluide commun à tous les dispositifs ou plusieurs canaux fluidiques parallèles, chacun alimentant une colonne de dispositifs. Le canal ou les canaux sont formés par exemple dans un capot (non représenté).

La mise en œuvre de moyens optomécaniques facilite une telle intégration grâce aux techniques de multiplexage très bien maîtrisée dans le domaine de l'optique.

15 En outre, la mise en œuvre de techniques de fabrication microélectronique permet l'intégration d'un très grand nombre de dispositifs.

La sonde de reconnaissance équipant chaque dispositif est connue puisqu'elle dépend des adaptateurs fixés sur la partie fixe et la partie mobile qui sont eux-mêmes déterminés par la fonctionnalisation de chacune des parties. Le brin analysé détectable par chaque

20 dispositif est donc connu.

En localisant spatialement les sondes et donc les réponses données par chacun des dispositifs, il est possible de réaliser des mesures redondantes exploitables, et d'obtenir des taux d'erreurs faibles.

Le procédé décrit ci-dessus s'applique à un système de séquençage, cependant un tel

25 système permet de détecter plusieurs brins différents. Le liquide contient alors des fragments de génomes par exemple un génome de plusieurs milliers de bases. Celui-ci est injecté dans le canal ou les canaux du système et après une étape d'hybridation potentielle des brins sur les sondes de reconnaissance adéquates, les fréquences de vibration des différents résonateurs sont mesurées.

Les fréquences peuvent être mesurées en continu, permettant de suivre le processus d'hybridation.

Le dispositif de détection et le système de détection sont réutilisables ; après un cycle de séquençage, ils peuvent être rincés pour retirer les brins hybridés sur les sondes de reconnaissance SR.

Un exemple de procédé de rinçage utilise comme solution de rinçage une solution tampon (« buffer » selon la terminologie anglo-saxonne) sans ADN, par exemple de type tris-acétate, tris-EDTA, PBS (« Phosphate Buffered Saline »), HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) avec l'ajout d'un surfactant,

typiquement en faible quantité, i.e. de l'ordre de 0.1% ou inférieure. Le surfactant peut être du SDS (« Sodium dodecyl sulfate ») ou du TWEEN (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate). On fait circuler la solution de rinçage pour décrocher les brins d'ADN hybridés sur la sonde de reconnaissance. De préférence, la circulation ne doit pas se faire en circuit fermé. Cet exemple est uniquement donné à titre illustratif, l'Homme du Métier saura adapter les composants de la solution de rinçage en fonction de la nature des brins d'ADN et autres réactifs utilisés.

Il peut également être envisagé de remplacer les sondes de reconnaissance, celles-ci peuvent être retirées et remplacées par d'autres sondes pour modifier l'application du dispositif ou du système.

En faisant monter la température dans une gamme comprise par exemple entre 50 et 80°C, on peut obtenir un décrochage des sondes des accroches et les accroches deviennent libres pour mettre des nouvelles sondes.

Il est à noter que les résonateurs peuvent être mis en vibration à des fréquences différentes, par exemple ils peuvent avoir des fréquences de résonance mécanique différentes.

A titre d'exemple, en utilisant des sondes de reconnaissance de dimension linéaire de 50 micromètres, pour un système de séquençage comportant des groupes de 200 dispositifs munis de la même sonde de reconnaissance comprenant 150 paires de nucléotides. Le système de séquençage comprend $4 \cdot 10^4$ détecteurs optomécaniques/ cm^2 , i.e. environ 200 groupes de 200 dispositifs ayant la même sonde de reconnaissance et donc capables

de détecter 200 domaines de séquences différentes. Ce système permet alors d'analyser un génome complet viral de 30 kb, i.e. 30000 bases ou nucléotides, en une seule série de mesure.

5 Dans un autre exemple, chaque dispositif mesure 40 µm de côté, ce qui permet de réaliser des systèmes de séquençage ayant une densité de dispositifs de $62,5 \times 10^3 \text{ cm}^2$. Comme cela a déjà été mentionné ci-dessus, le dispositif de détection et le système de détection peuvent avantageusement être réalisés au moins en partie par des techniques de la microélectronique.

10 La ou les parties mobiles et la ou les parties fixes et éventuellement ou les guides d'onde sont réalisés par dépôt de couches sur un substrat et lithographie et gravure. Les pistes électriques sont également réalisées par dépôt et gravure.

Les couches polymères ainsi que les précurseurs d'adaptateur sont par exemple déposés et localisés par lithographie et gravure.

15 Le capot est par exemple en verre et est structuré pour former avec le substrat le canal ou les canaux fluidiques.

Le capot est rapporté sur le substrat et est par exemple collé à celui-ci. Lors d'une étape suivante, un liquide contenant les adaptateurs est injecté dans le canal ou les canaux. Le liquide est un liquide physiologique. Les adaptateurs se fixent alors sur les précurseurs d'adaptateur. Pendant la phase d'accrochage, le liquide est au repos ou en circulation
20 générant un effort de cisaillement sur les parties fixes et mobiles.

Typiquement, si l'on ne met pas en œuvre de circulation une sédimentation et une mauvaise lecture, avec un risque de faux positifs est susceptible de survenir. Toutefois, si l'on met en œuvre une circulation de liquide trop rapide, une mauvaise accroche entraînant un risque de faux négatifs est susceptible de survenir. L'Homme du métier
25 saura adapter la vitesse de circulation de liquide. Par exemple, on peut prévoir une vitesse entre 1 nl/min et plusieurs mL/min.

Lors d'une étape suivante, le liquide physiologique contenant les sondes de reconnaissance est injecté dans le canal ou les canaux. Les sondes se fixent par une extrémité à un adaptateur sur la partie fixe et par une autre extrémité sur la partie

mobile. Pendant la phase d'accrochage des sondes, le liquide est au repos ou en circulation générant un effort de cisaillement sur les parties fixes et mobiles.

Il est à noter que les dispositions relatives de deux dispositifs voisins sont telles qu'il n'y pas de risque qu'une sonde se fixe sur une partie mobile d'un dispositif et sur une partie fixe d'une partie fixe d'un autre dispositif.

Le dispositif de détection et le système de détection présentent l'avantage d'utiliser des matériaux et techniques maîtrisées. Ils présentent une bonne robustesse.

En outre, l'association d'un grand nombre de dispositifs de séquençage permet de nombreuses applications, tels que le traitement en parallèle et le profilage de séquences codantes, la sélection et la localisation de gènes, le traitement en parallèle de mutations multiples, la sélection et la localisation de variants viraux.

Un dispositif de détection tel que décrit précédemment de bases nucléiques ou nucléobases d'un brin d'ADN ou d'ARN permet de détecter un niveau d'hybridation entre une sonde de reconnaissance et une séquence donnée de nucléotides. Plus la sonde de reconnaissance et la séquence sont complémentaires, plus le niveau d'hybridation est important.

Le dispositif illustré sur la figure 8A reprend un exemple d'agencement décrit précédemment en liaison avec la figure 6. La sonde génétique SR est rattachée d'une part à une partie fixe 2 et d'autre part à une partie mobile 4, par exemple sous forme d'un disque, et en particulier une surface 4.2 de ce disque. L'ajout de la sonde SR sur le disque résonant 4 provoque une augmentation de la masse en vibration et, comme illustré sur la figure 8B (donnant de manière schématique une courbe d'évolution C_0 de la fréquence de résonance du disque 4 en fonction du temps) une diminution de la fréquence de résonance (portion P1 sur la courbe C_0). Un tel agencement est susceptible d'induire un décalage vers le bas de la fréquence de résonance moindre par rapport à un agencement conventionnel où la sonde génétique SR serait attachée entièrement sur la partie mobile 4.

En effet, avec un agencement tel que proposé où la sonde SR est rattachée d'une part au disque 4 et d'autre part à la partie fixe 2, la masse de la sonde SR est plus faiblement couplée avec le mouvement vibratoire du disque 4 sur sa partie proche de la partie fixe 2.

Les figures 9A-9B servent à illustrer lorsqu'un brin d'ADN dit « partiellement complémentaire » BPC vient se lier à la sonde SR car ce brin BPC comporte une ou plusieurs bases communes avec une région ciblée de la sonde SR.

L'ajout de la masse du brin partiellement complémentaire BPC au système vibratoire constitué par le disque 4 et la sonde SR résulte en un décalage vers le bas de la fréquence de résonance (portion P2 de la courbe de fréquence de résonance, le décalage étant égal à $\Delta f_{\text{mismatch}}$) lié à un effet de masse pur. Il n'y a pas de force supplémentaire exercée par la sonde SR sur la partie mobile 4 autre que la masse dans ce cas, consécutive à l'accroche de ce brin partiellement complémentaire BPC.

Dans l'exemple illustré sur les figures 10A-10B, un brin d'ADN parfaitement complémentaire BIC s'hybride à la sonde SR car il comporte la séquence complémentaire exacte à la séquence ciblée par la sonde SR. Le premier effet (portion P3a de la courbe C2 de fréquence de résonance) réside en un ajout de masse traduit par une diminution de la fréquence de résonance lié à la solidarisation du brin complémentaire avec la sonde SR sur quelques bases, couplant ainsi la masse du brin BIC à celle de la sonde SR et la partie mobile 4. Plus l'accroche des nucléo-bases complémentaires progresse, plus une double hélice d'ADN double brin a tendance à se constituer. La constitution d'une double hélice, éventuellement parfaite, liée à la complémentarité, éventuellement parfaite, des deux séquences, va générer une force de tension exercée par cette double hélice sur la partie mobile 4 via l'accroche de la sonde SR sur la surface 4.2. Cette force supplémentaire de tension apporte une plus grande raideur au système formé par le brin BIC reconnu – la sonde SR – la partie mobile 4 ce qui se traduit par une ré-augmentation de la fréquence de résonance dans ce cas (portion P3b). Enfin, à mesure que la double hélice entre le brin reconnu et la sonde SR est réalisée, le couplage mécanique entre la masse des deux brins respectivement reconnu et celui de la sonde SR augmente et le mouvement vibratoire de la partie mobile 4 diminue ce qui résulte en fin d'expérience en une diminution de la fréquence de résonance (décalage final de la fréquence de résonance $\Delta f_{\text{complementary}}$) de plus grande intensité que pour le décalage $\Delta f_{\text{mismatch}}$ de l'exemple précédent avec un brin partiellement complémentaire. Le décalage de fréquence de résonance traduit ainsi le niveau d'hybridation.

Il est possible de faire un étalonnage du système en mesurant la courbe C2 avec le brin BIC. De cette manière, lors des mesures suivantes, il est possible de reconnaître immédiatement si l'on détecte un brin entièrement compatible BIC ou un brin partiellement compatible BPC.

- 5 Un dispositif de détection et un système de détection tels que décrits précédemment s'appliquent au séquençage d'au moins un brin de nucléotides.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de détection d'au moins un brin de nucléotides comportant un support (3),
au moins une partie mobile (4) par rapport au support (3), des moyens de mise en
5 vibration de la partie mobile (4) à une fréquence donnée, des moyens de mesure de la
fréquence de vibration de la partie mobile (4), une sonde de reconnaissance (SR) reliant
mécaniquement une partie fixe (2) solidaire du support et la partie mobile (4), la sonde de
reconnaissance (SR) comportant au moins une séquence de nucléotides.
- 10 2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les moyens de mise en vibration de la
partie mobile sont configurés pour mettre en vibration la partie mobile à sa fréquence de
résonance.
- 15 3. Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel les moyens de mesure de
la fréquence de vibration sont des moyens opto-mécaniques.
4. Dispositif selon la revendication 3, dans lequel les moyens de mesure de la fréquence
de vibration comportent au moins un guide d'onde couplé optiquement avec la partie
mobile, une source de lumière pour injecter de la lumière dans le guide d'onde et une
20 unité de traitement de la lumière sortant du guide d'onde.
5. Dispositif selon la revendication 4, dans lequel la partie mobile est un disque, un
anneau, un hippodrome ou une ellipse suspendu(e) par au moins un pied.
- 25 6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, comportant plusieurs sondes identiques
reliant la partie mobile au support.
- 30 7. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel la partie fixe comporte un
premier précurseur d'adaptateur et un premier adaptateur dont une extrémité est fixée
au premier précurseur d'adaptateur et l'autre extrémité comporte une séquence de

nucléotides hybridée avec une extrémité de la sonde de reconnaissance, et dans lequel la partie mobile comporte un deuxième précurseur d'adaptateur et un deuxième adaptateur comprenant une sonde dont une extrémité est fixée au deuxième précurseur d'adaptateur et l'autre extrémité comporte une séquence de nucléotides hybridée avec
5 une extrémité de la sonde de reconnaissance.

8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel les moyens de mise en vibration de la partie mobile (4) à une fréquence donnée sont de type électrostatique comportent une électrode sur la partie fixe et une électrode sur la partie mobile.

10

9. Ensemble comportant le dispositif selon l'une des revendications précédentes et un canal fluide assurant la mise en contact d'un liquide contenant ledit brin analysé et de la sonde de reconnaissance.

15

10. Système comportant une pluralité de dispositifs selon l'une des revendications 1 à 8.

11. Système selon la revendication 10, dans lequel les dispositifs sont répartis en groupe, chaque groupe comportant des sondes de reconnaissance ayant la même structure de nucléotides.

20

12. Système selon la revendication 11, dans lequel les sondes de reconnaissance sont choisies de sorte qu'en une seule mesure un génome complet est analysé.

25

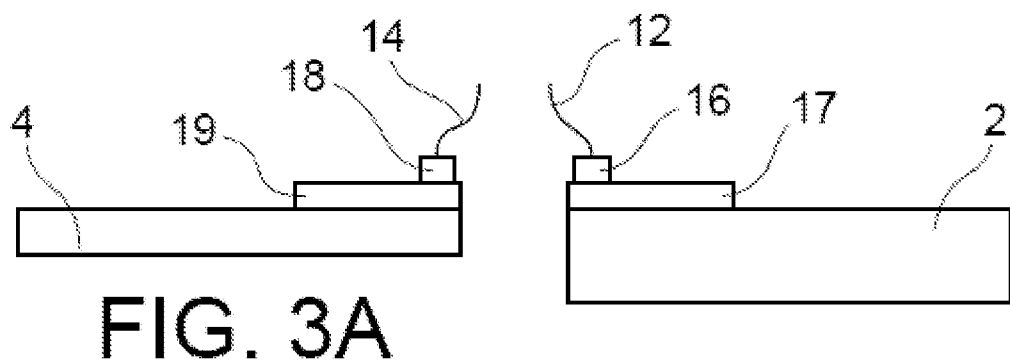
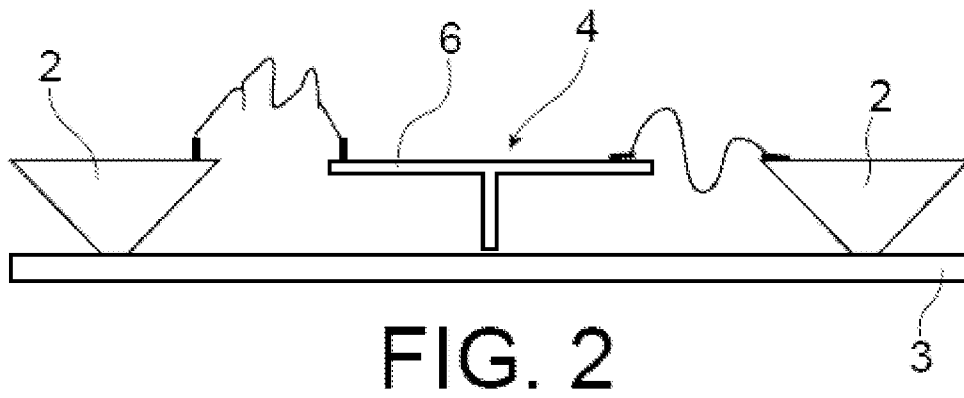
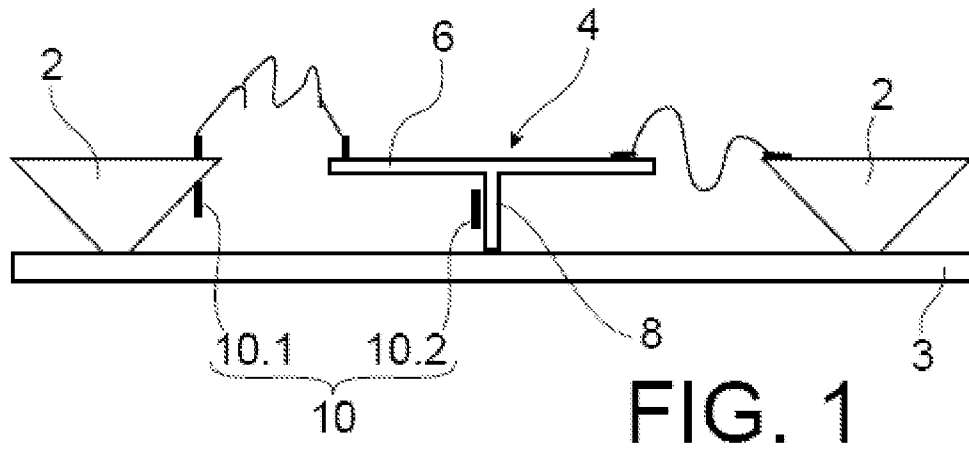
13. Procédé de détection pour le séquençage d'au moins une séquence de nucléotides comportant :

- la mise en contact d'un liquide contenant ladite séquence avec un dispositif résonant comportant une sonde de reconnaissance reliant une partie fixe et une partie mobile du dispositif résonant,
- la mise en vibration de la partie mobile,

- la mesure de la variation de la fréquence de vibration de la partie mobile due à l'hybridation entre la sonde de reconnaissance et la séquence de nucléotides.

5 14. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel la partie mobile est mise en vibration à sa fréquence de résonance.

15. Procédé selon l'une des revendications 13 ou 14, dans lequel la partie mobile est mise en vibration avec une amplitude de l'ordre de 0,1 nm et/ou dans lequel la partie mobile est mise en vibration à une fréquence comprise entre 100 MHz et 1 GHz.



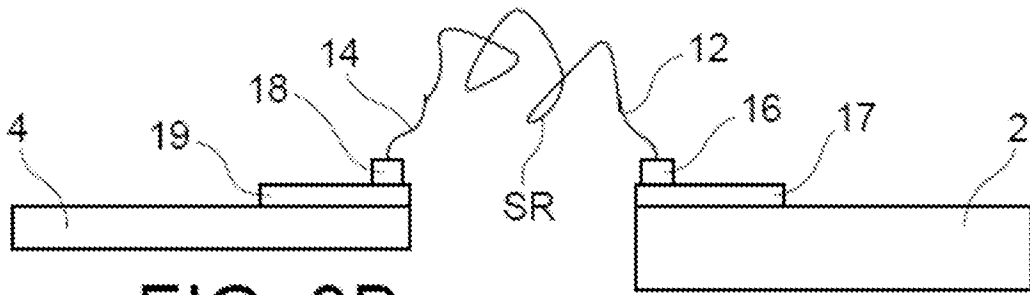


FIG. 3B

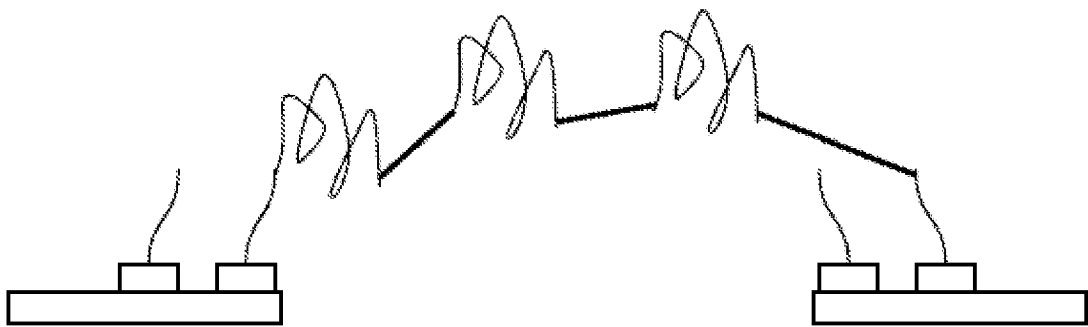


FIG. 4

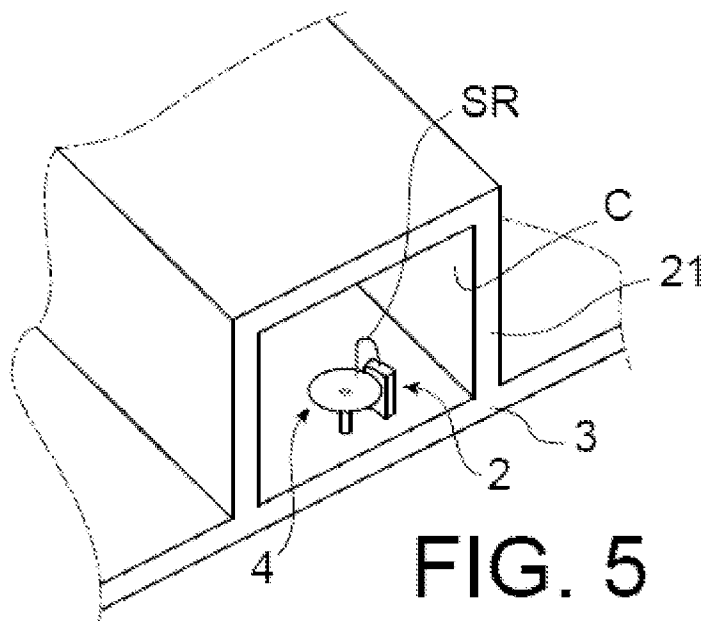


FIG. 5

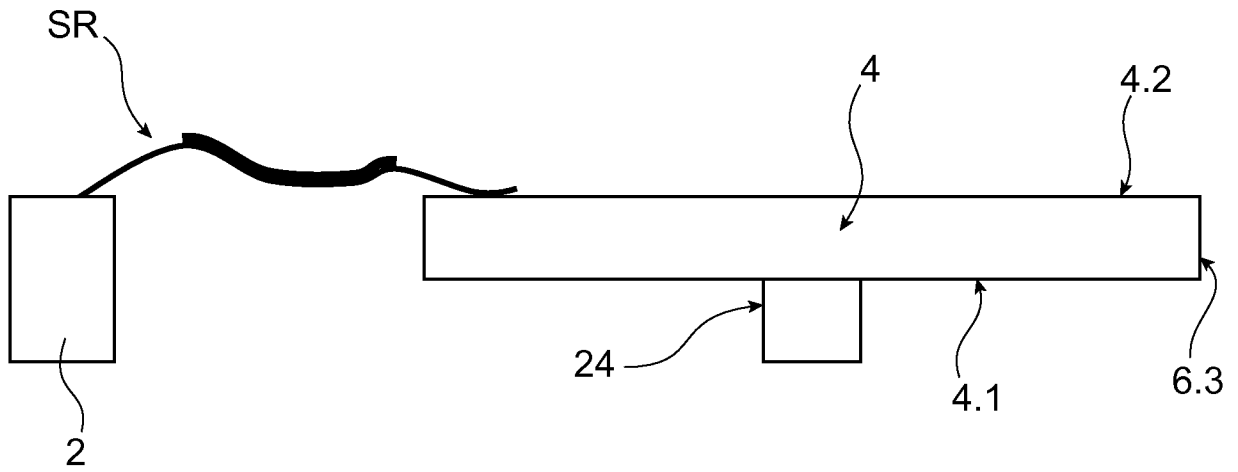


FIG. 8A

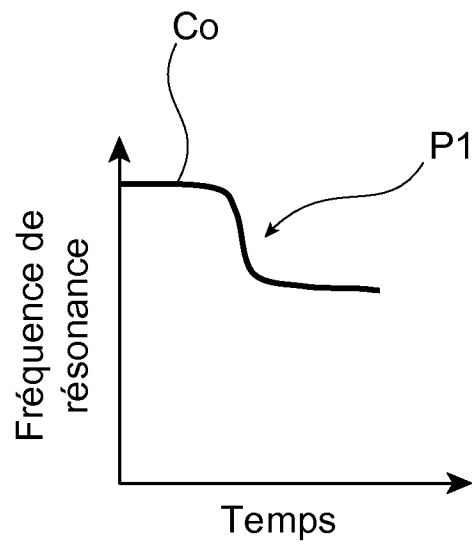


FIG. 8B

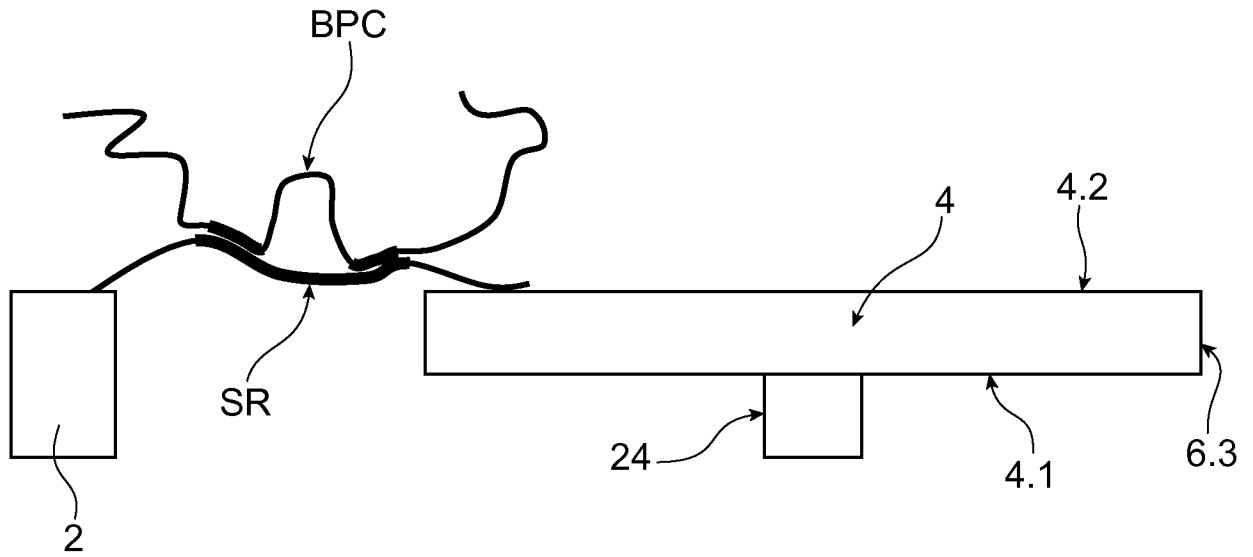


FIG. 9A

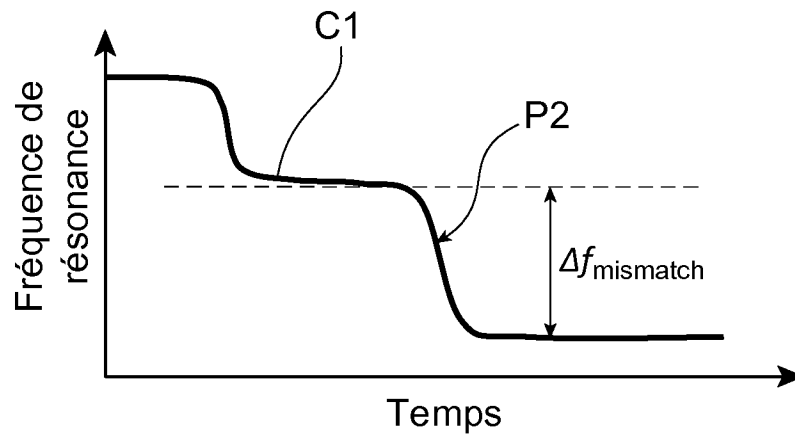


FIG. 9B

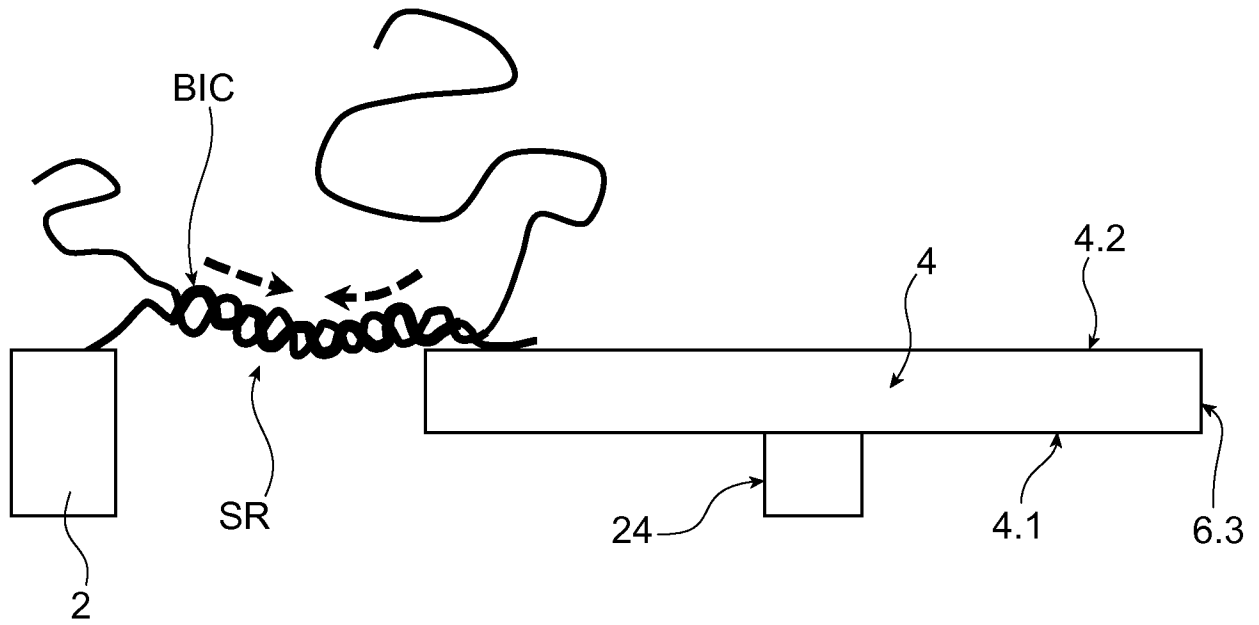


FIG. 10A

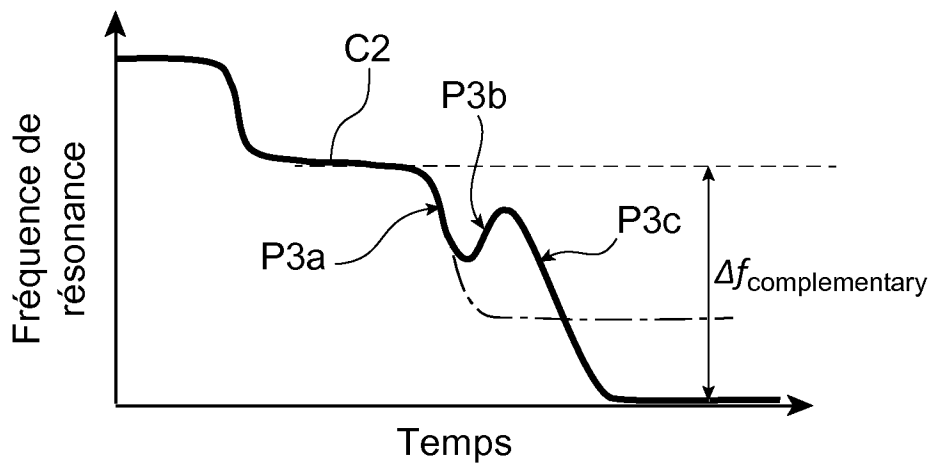


FIG. 10B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2022/052345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/6825</i> (2018.01)i; <i>C12Q 1/6874</i> (2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021140302 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR] ET AL.) 15 July 2021 (2021-07-15) p. 2, l. 5 - p. 3, l. 25; p. 7, ll. 1-5; p. 9, ll. 1-3; p. 9, ll. 17-28; p. 19, l. 23 - p. 20, l. 7; claim 1; fig. 12	1-15
Y	US 2005164236 A1 (SU XIAODI [SG] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs 7, 8, 11, 13, 37, 39; fig. 4	1-15
Y	STASSI STEFANO ET AL. "Nanomechanical DNA resonators for sensing and structural analysis of DNA-ligand complexes" , Vol. 10, No. 1, 12 April 2019 (2019-04-12), NATURE COMMUNICATIONS, Retrieved from the Internet: http://www.nature.com/articles/s41467-019-09612-0 DOI: 10.1038/s41467-019-09612-0 XP055973325 abstract; p. 2, right-hand column, 1st - 3rd paragraphs; p. 3, right-hand column, 2nd - 3rd paragraphs; fig. 4	1-15
A	WO 2016160877 A1 (RAPID PATHOGEN SCREENING INC [US]) 06 October 2016 (2016-10-06) the whole document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 March 2023		Date of mailing of the international search report 29 March 2023
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Ripaud, Leslie Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2022/052345

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIL-SANTOS EDUARDO ET AL. "Optomechanical detection of vibration modes of a single bacterium" <i>NATURE NANOTECHNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, INC, LONDON,</i> Vol. 15, No. 6, 13 April 2020 (2020-04-13), pages 469-474, [retrieved on 2020-04-13] DOI: 10.1038/S41565-020-0672-Y ISSN: 1748-3387, XP037168391 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2022/052345

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021140302	A1	15 July 2021	FR	3106005	A1	09 July 2021
				US	2023081434	A1	16 March 2023
				WO	2021140302	A1	15 July 2021
US	2005164236	A1	28 July 2005	SG	110153	A1	28 April 2005
				US	2005164236	A1	28 July 2005
WO	2016160877	A1	06 October 2016	NONE			

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/6825 C12Q1/6874 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) 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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2021/140302 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR] ET AL.) 15 juillet 2021 (2021-07-15) p. 2, l. 5 - p. 3, l. 25; p. 7, l. 1-5; p. 9, l. 1-3; p. 9, l. 17-28; p. 19, l. 23 - p. 20, l. 7; revendication 1; fig. 12 -----	1-15
Y	US 2005/164236 A1 (SU XIAODI [SG] ET AL) 28 juillet 2005 (2005-07-28) para. 7, 8, 11, 13, 37, 39; fig. 4 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
21 mars 2023	29/03/2023	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Ripaud, Leslie	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>STASSI STEFANO ET AL: "Nanomechanical DNA resonators for sensing and structural analysis of DNA-ligand complexes", NATURE COMMUNICATIONS</p> <p>, vol. 10, no. 1 12 avril 2019 (2019-04-12), XP055973325, DOI: 10.1038/s41467-019-09612-0 Extrait de l'Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41467-019-09612-0 résumé; p. 2, colonne de droite, 1er-3ème para.; p. 3, colonne de droite, 2ème - 3ème para.; fig. 4</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>WO 2016/160877 A1 (RAPID PATHOGEN SCREENING INC [US]) 6 octobre 2016 (2016-10-06) le document en entier</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>GIL-SANTOS EDUARDO ET AL: "Optomechanical detection of vibration modes of a single bacterium", NATURE NANOTECHNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, INC, LONDON, vol. 15, no. 6, 13 avril 2020 (2020-04-13), pages 469-474, XP037168391, ISSN: 1748-3387, DOI: 10.1038/S41565-020-0672-Y [extrait le 2020-04-13] le document en entier</p> <p>-----</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2022/052345

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2021140302 A1	15-07-2021	FR 3106005 A1	09-07-2021
		US 2023081434 A1	16-03-2023
		WO 2021140302 A1	15-07-2021

US 2005164236 A1	28-07-2005	SG 110153 A1	28-04-2005
		US 2005164236 A1	28-07-2005

WO 2016160877 A1	06-10-2016	AUCUN	
