



(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2016/078905

(22) Date de dépôt international :
25 novembre 2016 (25.11.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
16168001.2 03 mai 2016 (03.05.2016) EP
16180724.3 22 juillet 2016 (22.07.2016) EP

(71) Déposant : BIOMÉRIEUX [FR/FR] ; 69280 Marcy
L'etoile (FR).

(72) Inventeurs : ALIX, David ; 4 Rue de Villeneuve, 35140
Gosné (FR). MINASSIAN, Edgar ; 340 Route de Sain Bel,
69210 Lentilly (FR). RAYMOND, Jean-Claude ; 20 Allée
le Clos du Centre, 69690 Bessenay (FR). WANDELS, Phi-
lippe ; 10 Rue des Dahlias, 69003 Lyon (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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,

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR MAGNETIC EXTRACTION OF COMPONENTS IN A LIQUID SAMPLE

(54) Titre : PROCEDE ET SYSTEME EXTRACTION MAGNETIQUE DE COMPOSANTS DANS UN ECHANTILLON LIQUIDE

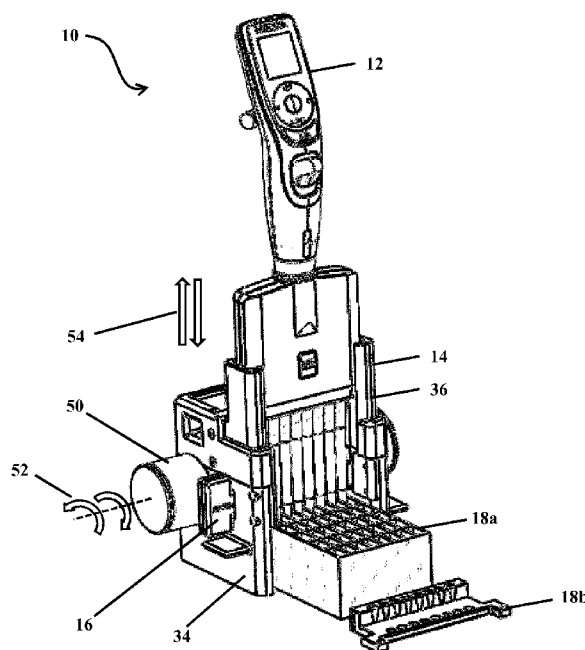


FIGURE 1

(57) Abstract: The invention relates to a system for extracting analytes from a biological sample, which comprises: an electronic pipette (12) having pipette cones with a tip (21); a well holder (18a, 18b); a pipette holder (14) comprising: a base (34) into which each well holder can be inserted; a pipette bracket (36) in which the pipette (12) is inserted, movable relative to the base (34) between a first position in which the tips (21) of the cones are inserted into a well (62, 69) of the holder (18a, 18b) and at least one second position in which the tips (21) are outside said wells (62, 69); a recess (78) opposite the pipette cones (20) above the tips thereof when the pipette bracket (36) is in the first position, and facing the tips (21) of the pipette cones (21) when the pipette bracket is in the second position; and a magnetised part (16) removably inserted into the recess (78).

(57) Abrégé : Un système d'extraction d'analytes d'un échantillon biologique, comprend: - une pipette (12) électronique ayant des cônes de pipette avec une pointe (21); - un support de puits (18a, 18b); un porte-pipette (14) comprenant: - un socle (34) apte à loger de manière amovible chaque support de puits; - un support de pipette (36) dans lequel est insérée la pipette (12), et mobile par rapport au socle (34) entre une première position dans laquelle les pointes (21) des cônes sont logées dans un puits (62, 69) du support (18a, 18b) et au moins une deuxième position dans laquelle les pointes (21) sont hors desdits puits (62, 69); - un logement (78) en face des cônes de pipette (20) au-dessus de leur pointe lorsque le support de pipette (36) est dans la première position, et en face des pointes (21) des cônes

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (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, 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).

Publiée:

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

PROCEDE ET SYSTEME EXTRACTION MAGNETIQUE DE COMPOSANTS DANS UN ECHANTILLON LIQUIDE

DOMAINE DE L'INVENTION

5

L'invention a trait au domaine de l'extraction de composants contenus dans une solution en utilisant des particules magnétiques.

10

L'invention trouve particulièrement application dans le domaine de la préparation d'échantillon biologique, notamment dans la mise en œuvre de diagnostic *in vitro*, par la capture d'analytes d'origine biologique (acides nucléiques, microorganismes, protéines, peptides, etc.) présents dans une solution.

ETAT DE LA TECHNIQUE

15

A l'origine développée pour l'extraction d'acides nucléiques présents dans un échantillon biologique et décrite dans le document US 5 234 809, la technologie « BOOM® » consiste à introduire dans un échantillon liquide des particules magnétiques capables de se lier avec des composants d'intérêt, puis à séparer les particules magnétiques de l'échantillon à l'aide d'un ou plusieurs aimants. Les particules ainsi capturées peuvent alors subir un traitement ultérieur par exemple pour libérer leurs composants dans une solution de récupération. En raison de l'efficacité de cette technique, de nombreux dispositifs ont été développés et commercialisés, notamment pour l'ADN et l'ARN, ...), tant des dispositifs manuels (par exemple le NucliSENS-miniMAG® du demandeur) que des dispositifs automatisés (NucliSENS-easyMAG® du demandeur). Ces dispositifs automatisés souffrent cependant de diverses limitations.

Une première limitation concerne leur polyvalence et leur encombrement. En effet, ces dispositifs sont le plus souvent des automates lourds et encombrants qui sont conçus pour mettre en œuvre une séquence de traitements non modifiable par l'utilisateur. Un automate est ainsi conçu pour un seul type d'extraction, par exemple conçu pour la purification d'acides nucléiques mais incapable de mettre en œuvre une immuno-concentration magnétique.

Une deuxième limitation concerne les circuits d'injection et d'aspiration des différents liquides utilisés lors de l'extraction. Le nombre de liquides étant important, ceci implique des circuits également nombreux et/ou complexes. De plus, en raison de possibles contaminations, ces circuits d'injection/aspiration doivent être régulièrement nettoyés, ce qui implique la mise hors service des dispositifs.

Une troisième limitation concerne les opérations de brassage qui sont mises en œuvre pour obtenir l'homogénéité de l'échantillon comprenant les particules magnétiques avant leur capture, pour maximiser la capture par ces dernières des analytes d'intérêt ou pour laver efficacement les particules magnétiques. Ce type de brassage nécessite usuellement des mécanismes complexes, par exemple à base d'aimants mobiles qui mettent en mouvement les particules magnétiques.

La quatrième limitation concerne les différents liquides utilisés lors de l'extraction. Usuellement, les étapes mises en œuvre pour l'extraction sont réalisées dans un ou à partir d'un seul récipient. De fait, ce récipient fixe un volume identique pour tous les liquides en jeu (e.g. l'échantillon, les différentes solutions de lavage, la solution d'élution, etc...), ce qui limite l'efficacité globale du processus d'extraction. En effet, certains traitements (e.g. le lavage) nécessitent de grands volumes pour être pleinement efficaces alors que d'autres traitements se contentent d'un petit volume de liquide (e.g. l'élution).

EXPOSE DE L'INVENTION

Le but de la présente invention est de proposer un procédé d'extraction de composants dans un échantillon liquide à l'aide de particules magnétiques qui offre une grande liberté dans le choix des volumes liquides, en particulier jusqu'à 10 ml, utilisés lors de l'extraction.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé d'extraction de composants contenus dans un échantillon biologique sous forme liquide, lesdits composants étant aptes à se fixer sur des particules magnétiques, le procédé comprenant :

- une phase de mélange de l'échantillon avec les particules magnétiques;
- une phase d'aspiration du mélange depuis un puits dans un cône de pipette tubulaire comprenant une pointe destinée au pipetage de liquide;
- une phase de capture des particules magnétiques sur une paroi interne du cône de pipette :
 - en appliquant un premier champ magnétique au cône de pipette, ledit champ étant apte à attirer et maintenir les particules magnétiques dans une zone prédéterminée du cône de pipette, dite de « capture », au-dessus de la pointe de celui-ci ;
 - et en appliquant au moins un cycle d'aspiration et de refoulement du mélange contenu dans le cône de pipette dans un puits;
- au moins une phase de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette en :
 - refoulant le mélange contenu dans le cône de pipette ; et

- en appliquant depuis un puits contenant une solution de lavage au moins un cycle d'aspiration et de refoulement de la solution de lavage dans le cône de pipette ;
- une phase de migration des particules magnétiques sur la paroi interne du cône, depuis la zone de capture jusqu'à la pointe du cône de pipette, en réalisant un déplacement relatif du cône de la pipette par rapport au premier champ magnétique ;
- et une phase de transfert desdites particules magnétiques ayant migré dans la pointe du cône de pipette dans un puits de récupération contenant une solution.

En d'autres termes, l'invention tire avantage d'un cône de pipette dans lequel des cycles d'aspiration et de refoulement peuvent être réalisés en trempant sa pointe dans un puits. Grâce à de tels cycles, il est possible de capturer la totalité des particules présentes dans un échantillon de volume très supérieur à celui du volume, i.e. le cône, dans lequel l'extraction est réalisée. Il est même possible de faire passer dans le cône un volume cumulé de liquide bien supérieur au volume de l'échantillon lui-même, en réglant le nombre de cycles d'aspiration et de refoulement. De la même manière, le volume de la ou des solution(s) de lavage utilisée(s) le cas échéant lors de l'extraction peut être très supérieur au volume du cône. La phase de migration permet quant à elle de localiser les particules magnétiques dans une portion du cône, la pointe, qui peut tremper dans un puits de volume très réduit. Le volume de la solution de récupération peut donc être faible si nécessaire. Le volume de la solution de récupération est ainsi indépendant du volume de l'échantillon et du volume du cône de pipette dans lequel est réalisée l'extraction. Grâce à l'invention, il est par conséquent possible d'optimiser chaque volume de liquide utilisé, et ainsi optimiser l'extraction.

De plus, en raison de la géométrie des cônes en forme de tube et des cycles d'aspiration refoulement, il est obtenu un brassage efficace de l'échantillon dans les cônes, brassage par exemple mis en œuvre avant la capture, ainsi qu'un lavage efficace, et ce sans faire appel à des mécanismes de type aimants mobiles. En outre, les inventeurs ont noté qu'un lavage efficace est obtenu dans le cône alors même que les particules sont capturées sur la paroi du cône de pipette. Un grand volume de solution de lavage peut être utilisé, augmentant encore l'efficacité du lavage. De fait, toutes les étapes de l'extraction (brassage, capture, lavage, transfert dans une solution de récupération) peuvent être réalisées dans le cône de pipette.

Selon un mode de réalisation, le déplacement du premier champ magnétique consiste à déplacer le cône de pipette parallèlement à un axe longitudinal dudit cône, et à conserver constant le premier champ magnétique, l'axe longitudinal du cône de pipette restant à égale distance du premier champ magnétique lors du déplacement du cône de pipette.

En d'autres termes, la migration des particules peut être mise en œuvre de manière simple en déplaçant le cône de pipette par rapport, par exemple, un aimant permanent.

Selon un mode de réalisation, la phase de transfert comprend :

- 5 - le placement de la pointe du cône de pipette dans le puits de récupération ;
 - et l'application d'un second champ magnétique depuis le fond du puits de récupération de manière à faire migrer dans le puits de récupération les particules magnétiques contenues dans la pointe du cône de pipette.
- 10 En particulier, le second champ magnétique est produit par un aimant positionné partiellement ou entièrement sous la pointe du cône de pipette. Le premier champ magnétique appliqué au cône de pipette est désactivé lors de l'application du second champ magnétique.

En d'autres termes, le second champ magnétique permet d'attirer simplement les particules
15 dans le puits de récupération, ce qui augmente la vitesse de récupération des particules magnétiques dans le puits de récupération, ainsi que le nombre de particules récupérées. De plus, le second champ magnétique capture automatiquement les particules magnétiques dans le puits de récupération. Par exemple, si la solution de récupération est un éluant, les composants liés aux particules ont été libérés et un technicien peut pipeter directement la
20 solution qui est dépourvue de particules magnétiques.

Selon une variante privilégiée, la phase de transfert comporte la désactivation du premier champ magnétique suivie de l'application de cycles d'aspiration et de refoulement de la solution du puits de récupération dans la pointe du cône de pipette, ladite application
25 comprenant :

- une première phase d'application des cycles à une première fréquence ;
 - suivie d'une deuxième phase d'application des cycles à une deuxième fréquence, inférieure à la première fréquence.
- 30 La première phase permet de désagréger efficacement l'amas de particules capturées sur le cône de pipette, également appelé « culot », et ainsi de remettre en suspension les particules dans la solution de récupération. La deuxième phase permet de continuer à brasser la solution tout en ne s'opposant pas à la migration des particules sous l'effet du champ magnétique. Ceci permet d'augmenter encore plus la vitesse de récupération et le nombre de particules
35 récupérées dans le puits de récupération. De plus si la solution est un éluant, dont la fonction est de libérer les composants capturés par les particules magnétiques, ces cycles ont pour effet de brasser les particules dans l'éluant, ce qui augmente l'efficacité de l'éluant, en particulier

lors de l'utilisation d'une solution d'élution dans le décrochage des analytes des particules magnétiques sans étape de chauffage.

5 Selon un mode de réalisation, le procédé comprend, préalablement à la phase de capture, une phase de brassage du mélange contenu dans le cône de pipette par l'application d'au moins un cycle d'aspiration et de refoulement dudit mélange dans le cône de pipette. En raison de la géométrie du cône, de forme tubulaire, il est possible d'obtenir un grand débit volumique rapporté à la section du cône, et par conséquent un brassage efficace. De plus, il existe de grandes turbulences dans le cône naturellement générées par l'écoulement du liquide, 10 turbulences qui augmentent l'efficacité du brassage. Avantageusement, un accessoire jetable est prévu dans le cône pour accroître cet effet.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend, préalablement à la phase de transfert, au moins une phase de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette en : 15

- en désactivant le champ magnétique ;
- en libérant les particules capturées en appliquant depuis un puits contenant une solution de lavage au moins un cycle d'aspiration et de refoulement de la solution de lavage dans le cône de pipette ;
- en appliquant une deuxième phase de capture sur une paroi interne du cône de pipette : 20
 - o en appliquant le premier champ magnétique au cône de pipette
 - o et en appliquant au moins un cycle d'aspiration et de refoulement du mélange contenu dans le cône de pipette dans le puits contenant la solution de lavage.

25 Selon un mode de réalisation, la libération des particules capturées comprend une phase d'application des cycles de manière à réaliser un va-et-vient d'un ménisque de ladite solution sur un culot de particules capturées dans le cône de pipette, ledit va-et-vient dudit ménisque étant réalisé sur une portion du cône inférieure à la longueur totale du cône de pipette.

30 Plus particulièrement, la libération des particules capturées comprend une deuxième phase d'application des cycles de manière à aspirer et refouler totalement la solution de lavage du cône. La fréquence d'application des cycles de la deuxième phase est inférieure à la fréquence d'application des cycles de la première phase.

35 Notamment, préalablement à la libération des particules capturées, le procédé comprend au moins deux phases de lavage mises en œuvre dans deux solutions de lavage distinctes.

Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux lorsque les composants contenus dans l'échantillon biologique sont des acides nucléiques (e.g. ADN, ARN).

Selon un autre mode de réalisation, les composants contenus dans l'échantillon biologique sont microorganismes (e.g. bactéries, champignons, levures), et dans lequel le procédé comprend une unique phase de capture et une unique phase de lavage.

5

En particulier, le mélange de l'échantillon avec les particules magnétiques a un volume supérieur à 1 millilitre, et de préférence supérieur ou égal à 2 millilitres, et dans lequel le volume du puits de récupération est inférieur ou égal à 200 microlitres, et de préférence inférieur ou égal à 100 microlitres.

10

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend, préalablement à la phase de transfert, au moins une phase de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette en :

- en aspirant de la solution de lavage dans ledit cône de pipette ;
- puis en modulant le premier champ magnétique appliqué aux particules magnétiques pour capturer celles-ci sur la paroi interne du cône de pipette ;
- puis en refoulant le liquide de lavage du cône de pipette.

15

En d'autres termes, la modulation du champ magnétique induit une réorganisation du culot de particules capturé sur la paroi du cône. Notamment, le culot peut changer de forme, s'étaler, glisser ou encore « rouler » sur la paroi du cône de pipette. Cette réorganisation du culot permet d'augmenter encore l'efficacité du lavage, et ce d'autant plus que cette réorganisation peut être mise en œuvre conjointement avec des cycles d'aspiration et de refoulement de la solution de lavage.

20

En particulier, la modulation du premier champ magnétique est réalisée :

- en déplaçant le cône de pipette parallèlement à un axe longitudinal dudit cône, et en conservant constant le premier champ magnétique ;
- et/ou en faisant défiler des aimants espacés les uns des autres devant les particules capturées.

30

En d'autres termes, la modulation est obtenue simplement, par exemple par un technicien qui fait glisser une barrette d'aimants ou par un automate qui met un mécanisme simple de translation d'une barrette d'aimants.

35

Selon un mode de réalisation, le volume du cône de pipette est au moins dix fois supérieur au volume du puits de récupération. Selon un mode de réalisation, le volume du mélange est au moins trois fois supérieur au volume du cône de pipette.

Selon un mode de réalisation, les composants appartiennent au groupe formé des acides nucléiques simple brin ou double brin (ADN et/ou ARN), des microorganismes, des protéines, et des peptides. Les composants sont constitués de tout autres types de molécules en fonction de la fonctionnalisation données aux particules magnétiques.

5

Le but de la présente invention est également de proposer un dispositif pour la mise en œuvre du procédé venant d'être décrit, qui soit peu encombrant et simple d'utilisation par un technicien de laboratoire.

10 A cet effet, l'invention a également pour objet un porte-pipette comprenant :

- un socle ;
- un évidement formé dans le socle apte à loger de manière amovible un support de puits ;
- un support de pipette comprenant un premier logement dans lequel est apte à être insérée, avantageusement de manière amovible, une pipette équipée d'au moins un cône de pipette tubulaire comprenant une pointe destinée au pipetage de liquide, le premier logement étant ouvert sur l'évidement du socle, le support de pipette étant mobile en translation par rapport au socle selon une direction parallèle à un axe des cônes de pipette et mobile entre une première position dans laquelle la pointe de chaque cône de pipette est logée dans un puits du support de puits et au moins une deuxième position dans laquelle ladite pointe est en dehors dudit puits;
- un second logement apte à loger de manière amovible une pièce aimantée, le second logement faisant face à chacun des cônes de pipette dans une position au-dessus de la pointe de celui-ci lorsque le support de pipette est dans la première position, et le second logement fait face à la pointe du cône de pipette lorsque le support de pipette est dans la deuxième position.

25

En d'autres termes, le porte-pipette reçoit une pipette et le technicien met en œuvre les étapes du procédé d'extraction, en montant/descendant la pipette, notamment pour faire migrer le culot de particule dans la pointe du ou des cônes de pipette, en introduisant des puits (sous la forme de plaque, de barrette, etc) dans le socle, et en actionnant la pipette.

30

Le porte-pipette, qui est peu encombrant et transportable, permet en outre la semi-automatisation du procédé d'extraction lorsqu'une pipette électronique est utilisée. Une telle pipette comprend en effet des circuits d'aspiration et de refoulement dans chaque cône de pipette l'équipant, et un circuit électronique à base de microprocesseur. Ce circuit électronique pilote les circuits d'aspiration/refoulement en fonction de consignes entrées par le technicien au moyen d'une interface équipant la pipette et/ou d'un ordinateur/tablette/smartphone connecté à la pipette (e.g. par une liaison sans fil de type

35

bluetooth), etc. Ces consignes sont par exemple constituées d'instructions de cycles d'aspiration/refoulement et/ou d'un choix d'un protocole particulier préenregistré dans la pipette.

- 5 La pipette électronique étant programmable, une grande polyvalence est en outre obtenue dans la définition du procédé d'extraction, qui peut être adapté en fonction d'une capture magnétique particulière souhaitée (e.g. : purification d'acides nucléiques, immuno-concentration magnétiques,...). Notamment, un protocole approprié à l'extraction visée peut être enregistré dans la pipette, le protocole étant défini en termes de nombre de cycles
10 d'aspiration et de refoulement, d'enchaînement de cycles, de fréquence de cycles, de durée entre les cycles, volumes définis, etc. Un système autonome et semi-automatisé est ainsi obtenu.

- Enfin, les cônes de pipette sont détachables de la pipette, et donc aisément remplaçables, sans
15 que la pipette ne soit mise hors service pendant une longue durée.

- Selon un mode de réalisation, le premier logement comprend une ouverture pour l'insertion et le retrait frontaux de la pipette dans le premier logement du support de pipette. L'insertion et le retrait frontaux de la pipette et des cônes en position minimisent le risque de toucher le
20 porte-pipette avec les pointes des cônes, et donc le risque de contamination du porte-pipette.

Selon un mode de réalisation, le second logement est réalisé dans le socle.

- En particulier, le support de pipette comporte un troisième logement dans lequel la pièce aimantée est apte à être logée de manière amovible pour faire face à chaque cône de pipette à
25 une position au-dessus de la pointe dudit cône lorsque le support de pipette est dans la deuxième position.

- En d'autres termes, lorsque la pièce aimantée (e.g. comprenant un ou plusieurs aimants
30 permanents) est présente dans le troisième logement, elle est solidaire des cônes de pipette et suit donc leur mouvement de translation par rapport au socle. Lors de tels mouvements, la pièce aimantée conserve donc les culots de particules magnétiques fixes dans les cônes. Le technicien peut ainsi par exemple monter la pipette pour déplacer plus aisément un support à puits dans le socle sans risquer de déplacer les culots de particules dans les cônes.

35

Selon un mode particulier, le second et troisième logements communiquent, et le support de pipette comprend des moyens aptes à maintenir de manière amovible la pièce aimantée dans le troisième logement. De cette manière, le technicien peut détacher la pièce aimantée du

support à pipette qui prend alors place automatiquement dans le socle en tombant dans le deuxième logement. Ce détachement a notamment lieu pour l'opération de migration des particules magnétiques dans les pointes des cônes.

5 Selon un mode de réalisation :

- le socle comprend au moins une roue dentée mobile en rotation ;
- et le support de pipette comprend une crémaillère coopérant avec la roue dentée pour translater le support de pipette par rapport au socle lors de la rotation de la roue dentée.

10 En particulier, le porte-pipette comprend un dispositif de verrouillage et de déverrouillage du support de pipette dans la première position. Notamment, le porte-pipette comprend au moins une poignée solidaire de la roue dentée pour faire tourner celle-ci et apte à se fixer de manière amovible à une poignée solidaire de la roue dentée d'un autre porte-pipette, ce qui permet donc d'augmenter le nombre de cônes de pipette pendant le procédé d'extraction.

15

L'invention a également pour objet un système pour l'extraction de composants contenus dans un échantillon biologique sous forme liquide, lesdits composants étant aptes à se fixer sur des particules magnétiques, le système comprenant :

- une pipette équipée d'au moins un cône de pipette tubulaire comprenant une pointe destinée au pipetage de liquide et d'un circuit d'aspiration et de refoulement dans chaque cône de pipette ;
- au moins un support de puits ;
- un porte-pipette comprenant :
 - un socle ;
 - un évidement formé dans le socle apte à recevoir de manière amovible chaque support de puits ;
 - un support de pipette comprenant un premier logement dans lequel la pipette est insérée, avantageusement de manière amovible, le premier logement étant ouvert sur l'évidement du socle, le support de pipette étant mobile en translation par rapport au socle selon une direction parallèle à un axe des cônes de pipette et mobile entre une première position dans laquelle la pointe de chaque cône de pipette est logée dans un puits du support de puits et au moins une deuxième position dans laquelle ladite pointe est en dehors dudit puits;
 - un second logement faisant face à chacun des cônes de pipette dans une position au-dessus de la pointe de celui-ci lorsque le support de pipette est dans la première position et le second logement faisant face à la pointe du cône de pipette lorsque le support de pipette est dans la deuxième position ; et
- une pièce aimantée logée de manière amovible dans le second logement.

Notamment, le porte-pipette est conforme au porte-pipette décrit plus haut.

L'invention a également pour but de proposer un support de puits pour la migration de
5 particules magnétiques depuis des pointes de cônes de pipettes dans des puits de récupération.

A cet effet, l'invention a également pour objet un support de puits, comprenant une pièce dans laquelle sont formés des évidements pour la réception des puits, et au moins un aimant faisant face à chacun des évidements formés dans ladite pièce.

10

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, donnée uniquement à titre d'exemple, et faite en relation avec les dessins annexés, dans lesquels des
15 références identiques désignent des éléments identiques, et dans lesquels :

- la figure 1 est une vue en perspective d'un système d'extraction selon l'invention ;
- les figures 2A et 2B sont des vues de face et en perspective d'une pipette électronique et de ses cônes de pipettes amovibles ;
- les figures 3A et 3B est des vues en perspective et de face d'un porte-pipette selon
20 l'invention ;
- les figures 4A et 4B est une vue de détail en coupe du porte-pipette de la figure 3, respectivement selon les plans A-A et B-B de la figure 3B ;
- la figure 5 est une vue en perspective d'une plaque « deepwell » comprenant des puits ;
- les figures 6A et 6B sont des vues en perspective d'un portoir magnétique et de tubes d'élution PCR pouvant se loger dans le portoir ;
25
- la figure 7 est une vue de face d'une pièce aimantée selon l'invention ;
- la figure 8 est un organigramme d'un procédé d'extraction selon l'invention ;
- la figure 9 est une photographie des cônes de pipette d'un système selon l'invention avec des culots de particules magnétiques placés environ à mi-hauteur des cônes ;
- la figure 10 est une photographie de ces mêmes cônes avec les culots placés dans les
30 pointes de ceux-ci ;
- la figure 11 est une photographie de tubes d'élution PCR dans lesquels ont été récupérées les particules magnétiques ;
- les figures 12 et 13 illustrent un second mode de réalisation du porte-pipette selon
35 l'invention ;
- la figure 14 est une vue en perspective de deux systèmes selon la figure 1 couplés au moyen de poignées de rotation ;

- la figure 15 est une vue schématique illustrant le va-et-vient d'un ménisque d'une solution sur un culot de particules pour détacher ce dernier de la paroi d'un cône de pipette .

5 Excepté pour la figure 15, la description est réalisée en relation avec des plans et photographies à une échelle réduite d'un système réel.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

10 En se référant aux figures 1 à 7, un système **10** d'extraction (figure 1) de composants contenus dans un échantillon liquide comporte une pipette électronique **12** (figures 2), un porte-pipette **14** (figures 3) dans lequel la pipette **12** est logée, un ou plusieurs support de puits **18a**, **18b** (figure 5 et 6) pouvant chacun être logé dans le porte-pipette **14**, et une première pièce aimantée **16** (figure 7).

15

La pipette **12**, qui est portable, comprend une rangée de cônes de pipettes **20**, et un corps **22** sur lequel sont montés les cônes **20** (figure 2A). Dans ce corps **20**, sont logés un circuit d'aspiration/refoulement de liquide dans les cônes **20** (par exemple un ensemble de pistons actionnés par un moteur électrique), et un circuit électronique de pilotage du circuit d'aspiration/refoulement. Le circuit électronique, qui comprend par exemple un microprocesseur et une ou plusieurs mémoires informatiques, est programmable, et embarque des instructions pour la mise en œuvre d'un ou plusieurs protocoles de pipetage, chaque protocole comprenant une ou plusieurs étapes. Le circuit électronique comprend également une interface homme machine **24** logée dans une poignée **26** du corps **22**, l'interface
20 comprenant un ensemble de boutons de sélection et de navigation **28** et un écran d'affichage **30** permettant la visualisation et la sélection de différents protocoles de pipetage enregistrés. L'utilisateur peut notamment programmer la pipette électronique **12**, e.g. en téléchargeant dans celle-ci des instructions depuis un ordinateur connecté à la pipette **12** au travers d'une liaison sans fil, par exemple Bluetooth. L'utilisateur peut également sélectionner, via
30 l'interface **24**, un protocole préenregistré. La pipette **12** est par ailleurs apte à aspirer un volume prédéfini de liquide dans chacun des cônes **20**, refouler un volume prédéfini depuis chacun des cônes, mettre en œuvre des cycles automatiques d'aspiration/refoulement de durée et de fréquence variable.

35 Comme illustré plus particulièrement à la figure 2B, les cônes **20**, de forme tubulaires et d'axe longitudinal X, sont amovibles en s'emboîtant dans des lobes **32** faisant saillie du corps **22**, ce qui permet leur remplacement. Les cônes sont par ailleurs constitués d'un matériau plastique, par exemple en polypropylène, ce qui a pour effet de les rendre « transparent » à un champ

magnétique et permet la capture de particules magnétiques, comme cela sera décrit plus en détails par la suite. Enfin, chaque cône **20** présente à son extrémité ouverte de pipetage un profil effilé **21**, ou « pointe ». Cette partie **21** a une section réduite dans un plan perpendiculaire à l'axe X, ce qui permet son introduction facilitée dans des récipients ou puits
5 comme cela est connu en soi.

La pipette électronique **12** est par exemple le modèle « VIAFLO II 8 canaux » commercialisé par la société ©INTEGRA Biosciences AG, Suisse, modèle dont les éléments sont décrits dans les demandes de brevets US 2009/071266, US 2009/074622, US2011076205 et US
10 2008/095671.

Le porte-pipette **14** comporte quant à lui (figures 3A et 3B) un socle **34**, destiné à être posé sur un plan de travail (e.g. une table ou une paillasse de laboratoire), ainsi qu'une partie mobile **36** par rapport au socle **34**. La partie mobile **36**, également nommée « support de
15 pipette », comporte un logement **38** dans lequel la pipette **12** peut être insérée de manière amovible et maintenue immobile comme illustré à la figure 1. Pour la translation du support de pipette **36** par rapport au socle **34**, le support **36** comporte une ou plusieurs crémaillères **40**, par exemple au nombre de deux, s'engrenant avec des roues dentées **42** montées sur un arbre
20 **44** mobile en rotation et logé dans le socle **34**. Une ou plusieurs tiges **46** sont en outre fixées au support **36** (resp. dans le socle **34**) et coulissent dans des orifices du socle **34** (resp. dans le support **36**), afin de guider le support **36** dans son mouvement de translation. Une ou deux poignées de rotation **50** sont en outre fixées au bout de l'arbre **44** afin de permettre à l'utilisateur de facilement tourner ce dernier selon les flèches **52** (figure 1) et donc faire
25 monter et descendre le support de pipette **36** tel qu'illustré par les flèches **54** (figure 1). Le mouvement de translation du support de pipette **36** par rapport au socle **34** est donc parallèle à l'axe X des cônes **20** lorsque la pipette **12** est placée dans le logement **38** du support **36**, et donc parallèle à la direction de la gravité lorsque le socle **34** est posé sur un plan de travail horizontal, de sorte que le support **36** « monte » ou « descend ».

Le socle **34** est ouvert sur sa face avant **56** pour permettre l'introduction et le retrait des supports de puits **18a**, **18b**, définissant ainsi un logement pour ces derniers. Ce logement est ouvert sur sa partie supérieure pour permettre aux cônes **20** de la pipette **12** d'atteindre lesdits supports de puits lorsque la pipette descend. Ainsi, comme décrit plus en détail ci-après, la pipette **12** peut prendre plusieurs positions par rapport au socle **34**, et donc par rapport à un
30 support de puits **18a**, **18b** logé dans ce dernier. En particulier, la pipette **12** peut prendre une position dans laquelle les pointes **21** des cônes **20** trempent dans des puits du support **18a**, **18b**, et au moins une position dans laquelle les pointes **21** ne trempent pas dans les puits, et sont à distance de ces derniers de manière à permettre la manipulation des supports de puits

par l'utilisateur et la capture de particules magnétiques dans une position centrale des cônes **20**.

En se référant aux figures 5 et 6, les supports de puits peuvent prendre plusieurs formes en fonction de l'extraction souhaitée. Notamment, un support de puits est une plaque **18a** compartimentée (figure 5), usuellement nommée « microplaque » de type « DeepWell ». Ce type de plaque comporte des rangées **60** de puits **52** dans lesquelles peut plonger la rangée de cônes de pipette **20**. Chaque rangée **60** peut ainsi recevoir un liquide particulier utilisé lors de l'étape d'extraction mise en œuvre par le système **10**. Le passage d'une rangée **60** à l'autre est alors réalisé simplement par l'utilisateur qui met à l'aplomb des cônes de pipettes **20** la rangée **60** particulière contenant le liquide nécessaire à l'étape devant être mise en œuvre.

Un autre support de puits, décrit à la figure 6A, est aimanté et spécifiquement conçu pour la migration de particules magnétiques depuis les pointes **21** des cônes de pipettes **20** dans des puits. Le support **18b** comprend à cet effet un corps **64** dans lequel est formée une rangée de logement **66** pouvant recevoir la rangée de cône de pipette **20**, et dans lequel est logée une seconde pièce aimantée **68** comprenant un ou plusieurs aimants permanents, par exemple un aimant permanent à proximité de chacun des puits **66**. La pièce aimantée **68** est placée sous les puits **66** ou en face de leur portions inférieures comme illustré. Ainsi, les pointes **21** des cônes de pipettes **20** sont placées au-dessus de la pièce aimantée **68** lorsque lesdites pointes sont plongées dans les puits **66**. Enfin, le support **18b** sert de portoir magnétique revêtant de manière amovible des tubes **69** dans les logements **66**, par exemple des tubes d'élution PCR tels qu'illustrés à la figure 6B, à des fins par exemple de transfert ultérieur du produit de l'extraction récupéré dans ceux-ci.

La première pièce aimantée **16**, dont la fonction est de capturer des particules aimantées dans les cônes **20** d'une manière décrite plus en détail par la suite, comprend quant à elle un ou plusieurs aimants permanents **72**, avantageusement une rangée d'aimants permanents séparés les uns des autres par des espaces **74**, et encore plus avantageusement un aimant permanent en face de chaque cône de pipette **20** lorsque la pièce **16** est entièrement logée dans le socle **34**. La pièce **16** comprend en outre une poignée **76** pour une meilleure préhension par l'utilisateur.

Un logement **78** pour la réception de la pièce aimantée **16** est prévu dans le socle **34**, le logement **78** étant placé de manière à ce que la pièce **16** soit en face des cônes de pipette **20** au-dessus de leur pointe **21**, et de préférence face à une zone centrale **80** à une hauteur supérieure au puits, lorsque les pointes **21** plongent dans les puits maintenus dans un support de puits. De cette manière, les particules sont capturées dans un volume du cône suffisamment grand pour ne pas former de bouchons dans les cônes.

Le porte-pipette **14** comporte également des moyens permettant de maîtriser la vitesse de remontée du support **36**. En particulier, la crémaillère et la roue dentée sont conçus pour qu'un demi-tour (180°) de la roue **50** permette de parcourir l'ensemble de la crémaillère, et une masselotte **58** intégrée dans chacune des poignées **50** de manière désaxée par rapport à l'arbre **44**. Ces masselottes, sous leur poids et l'effet de levier associé, génèrent un couple de rotation mettant en rotation l'arbre **44** tout en limitant le couple transmis à la main par l'utilisateur. De manière avantageuse, comme illustré à la figure 4A, une partie substantielle de l'arbre **44** est formé également d'une masselotte demi-cylindrique dans le même but. Cette assistance mécanique aide à soulever le support-de pipette, et limite donc les troubles musculo-squelettiques, et met en œuvre un frein qui permet à l'utilisateur de contrôler avec plus de précision la vitesse de montée et de descente du support **36**.

D'autres mécanismes de contrôle de la vitesse du support **36** peuvent être prévus, notamment un freinage magnétique. Par exemple, en se référant à la figure 4A, la masselotte **59** comprend un matériau aimantable (e.g. acier ou équivalent) et une troisième pièce aimantée **80** (parallélépipédique ou en forme d'arc de cercle concentrique à l'arbre **44**) est logée dans le socle **34**, de préférence à l'opposé de la pièce aimantée **16** vis-à-vis de l'arbre **44** pour ne pas perturber l'extraction. Lorsque la masselotte **59** de l'arbre passe devant la pièce aimantée **80**, le mouvement de rotation de l'arbre **44** est ralenti en raison du couple de freinage engendré. Ceci permet d'une part de compenser l'effort pour soulever la pipette lors de la montée (en jouant le rôle d'assistance pour l'utilisateur), et d'autre part de maîtriser la vitesse de remontée de la pipette lorsque l'on veut faire descendre les particules magnétiques en bas des cônes de pipette, comme cela sera décrit ci-dessous.

Un mécanisme de butée est également avantageusement prévu comme illustré à la figure 4B. Dans cette variante, une roue **84** en matériau déformable (e.g. en élastomère) est montée sur l'arbre **44** et comporte deux dents **86**, **88**. Une protubérance **82**, par exemple hémisphérique, fait par ailleurs saillie du socle **84** en face de la roue **84**. Lorsque l'utilisateur remonte la pipette **12** en actionnant la roue **50**, la première dent **86** rencontre la protubérance **82**. En augmentant le couple appliqué à la roue **50**, la dent **86** se plie, passe la protubérance **82**, et reprend sa forme. Dans cette position, la dent **86** peut alors reposer sur la protubérance **82**, la dureté de cette dent étant choisie pour qu'elle ne se plie pas sous l'action du poids de la pipette **12** et du porte-pipette **36**. La pipette est ainsi bloquée en position haute, l'utilisateur pouvant donc relâcher la roue **50**. La deuxième dent **88**, de plus grande dimension (e.g. longueur et/ou largeur) nécessite pour son passage un couple beaucoup important, et définit ainsi une butée pour éviter que le porte-pipette **36** ne se déboîte du socle **34**, à moins que l'utilisateur déploie une force apte à casser cette dent. En variante, la protubérance **82** est remplacée par une butée

comportant une bille montée sur ressort dans un logement du socle. La roue **84** peut ainsi être réalisée en un matériau dur. L'action de la première dent **86** a alors pour effet de pousser la bille dans son logement, permettant ainsi le passage de la dent **86**..

5 Il est à présent décrit un procédé d'extraction de composants contenus dans un échantillon liquide à l'aide de particules magnétiques, ce procédé étant mis en œuvre à l'aide du système venant d'être décrit. Le procédé se fonde sur l'association du porte-pipette, de la pipette électronique programmable et de cônes de pipette (e.g. d'un volume de 1250 µL) afin de
10 réaliser les différentes étapes de capture, de lavage et d'élution de particules magnétiques pour traiter un volume d'échantillon par cône de pipette compris entre 1 mL et 5 mL. La capture des particules magnétiques s'effectue séquentiellement dans les cônes de pipette au cours de cycles d'aspiration/refoulement sur l'ensemble du volume d'échantillon à traiter. A titre d'exemple, il est décrit en relation avec l'organigramme de la figure 8 un procédé de purification d'acides nucléiques viraux utilisant la chimie NucliSENS®, à savoir une
15 extraction des acides nucléiques à l'aide de particules de silice magnétiques.

Le procédé débute par une étape **100** de préparation des différents échantillons et réactifs nécessaires à la purification, suivie de ladite purification en **102**.

20 Notamment, la préparation **100** consiste, en **104**, à mélanger l'échantillon biologique comprenant des virus dont on souhaite extraire les acides nucléiques, avec un réactif de lyse chimique des virus (e.g. le réactif de lyse « Nuclisens miniMAG » de bioMérieux, de référence 200292, ou le réactif de lyse « Nuclisens easyMAG » de bioMérieux, de référence 280130), à raison de deux volumes de réactif de lyse pour un volume d'échantillon. Le
25 mélange est ensuite chauffé pendant 30 minutes à 56°C, libérant ainsi les acides nucléiques des virus d'une manière connue en soi. Des particules de silice magnétiques (e.g. des particules ayant un cœur paramagnétique, ferromagnétique ou ferrimagnétique présentant ou non une rémanence, recouvert d'une coque en silice), ayant pour propriété de se lier avec des acides nucléiques, sont alors introduites, en **106**, dans l'échantillon lysé.

30

La préparation **100** se poursuit, en **108**, par le remplissage de la microplaque **18a**, ayant des puits **62** de 5mL, et des tubes d'élution PCR **69** de 0,2 mL du portoir magnétique **18b** de sorte que :

- chaque puits de la première rangée de la microplaque **18a** est rempli de l'échantillon lysé
35 comprenant les particules de silice, ci-après « échantillon lysé ». Le volume total dans chaque puits de la première rangée est de préférence supérieur à 1,5 mL en raison de l'utilisation de la microplaque Deepwell 5 mL et des volumes manipulés par la pipette électronique ;

- chaque puits **66** de la deuxième rangée de la microplaque **18a** est rempli de 1250 µL de tampon de lavage (e.g. le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°2 » de bioMérieux de référence bMx 280131) ;
- chaque puits **66** de la troisième rangée de la microplaque **18a** est rempli de 1250 µL de tampon de lavage (e.g. le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°2 » de bioMérieux de référence bMx 280131) ;
- chaque tube d'élution PCR **69** logé dans le portoir magnétique **18b** est rempli d'un volume de 100 µL de tampon d'élution (e.g. le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°3 » de bioMérieux, de référence 280132).

10

L'utilisateur place alors :

- la pipette électronique **12**, avec sa rangée de cônes **20**, dans le logement **38** du porte-pipette **14**, en position relevée pour permettre l'introduction de la plaque **18a** ; et
- la plaque **18a** dans le logement **56** du socle **34** avec la première rangée de puits comprenant l'échantillon lysé à l'aplomb des cônes **20**.

15

L'extraction **102** débute par l'homogénéisation de l'échantillon lysé. Pour se faire, la pièce aimantée **16** n'est pas placée dans le socle **34** et n'interfère donc pas avec les cônes **20**. L'utilisateur tourne une des roues **50** de manière à plonger les pointes **21** des cônes **20** dans la rangée de puits de la plaque **18a** contenant l'échantillon lysé. Puis, il sélectionne à l'aide de l'interface **24** de la pipette **12** un premier protocole de pipetage comprenant au moins une phase d'aspiration/refoulement de l'échantillon lysé dans les cônes **20**, et lance le protocole sélectionné. Ces phases (e.g. au nombre de deux) comprennent chacune au moins un cycle d'aspiration/refoulement (e.g. cinq cycles) suivi d'une durée d'attente de plusieurs minutes, par exemple 5 minutes. Au sens de l'invention, un cycle d'aspiration et de refoulement consiste à remplir au moins au trois quart, par exemple complètement, les cônes puis à les vider complètement, à moins qu'il ne soit spécifié autrement par le programme.

20

25

Une fois l'homogénéisation terminée, les cônes **20** sont vides et leurs pointes **21** plongent dans les puits contenant l'échantillon lysé. La purification **102** se poursuit par la capture, en **112**, des particules de silice de l'échantillon lysé sur la paroi interne des cônes **20**. A cet effet, l'utilisateur place la pièce aimantée **16** dans le logement **78** du socle **34**, sélectionne à l'aide de l'interface **24** de la pipette **12** un second protocole de pipetage puis lance le protocole sélectionné. Le second protocole comprend une pluralité de cycles d'aspiration/attente/refoulement, e.g. une dizaine de cycles, une aspiration étant séparée d'un refoulement de quelques secondes, e.g. une dizaine de secondes. A chaque aspiration et chaque refoulement, une partie des particules contenues dans l'échantillon lysé est capturée sur la paroi des cônes de pipette grâce au champ magnétique produit par la pièce aimantée **16**.

30

35

Les particules magnétiques, et donc également leurs acides nucléiques liés, sont ainsi capturées sous le forme de culots de particules **100** en face de la pièce aimantée **16**, et de préférence sur une zone centrale à mi-hauteur des cônes **20**, comme illustré à la figure 9.

- 5 Une fois la capture terminée, l'échantillon lysé ayant été refoulé complètement des cônes **20** et la pièce aimantée **16** étant toujours en place, la purification **102** se poursuit par une première étape de lavage **114**. A cette fin, l'utilisateur soulève le porte-pipette **14** (resp. remonte la pipette **12**) de manière à libérer la plaque **18a** des cônes **20**, aligne la deuxième rangée de la plaque **18a** avec la rangée de cône **20** puis replace le porte-pipette (resp. fait descendre la pipette) de manière à faire tremper les pointes **21** des cônes dans les puits de la plaque **18a**. L'utilisateur sélectionne ensuite, à l'aide de l'interface **24**, un troisième protocole de pipetage comprenant au moins une phase d'aspiration/refoulement de l'échantillon lysé dans les cônes **20**, puis lance le protocole sélectionné. Le troisième protocole est par exemple identique au premier protocole. Le passage répété du tampon de lavage sur les culots de particules permet ainsi de laver ces derniers. Cette étape de lavage est avantageusement complétée, ou mise en œuvre de manière conjointe, à une modulation du champ magnétique capturant les particules sur les cônes. Par exemple, l'utilisateur fait remonter et descendre la pipette **12**, ce qui a pour effet de déplacer les culots de particules sur les cônes, ou bien la pièce aimantée **16** comprend un train d'aimants permanents et l'utilisateur fait coulisser dans un mouvement de va-et-vient la pièce aimantée **16** de son logement **78**, de sorte que l'intensité et les lignes de champs magnétiques capturant les culots varient, tout en conservant les particules capturées sur les cônes. La modulation du champ magnétique a ainsi pour effet de réorganiser les culots lors du lavage, et augmenter l'efficacité de celui-ci.
- 25 Un second lavage est ensuite mis en œuvre en **116** à l'aide du tampon de lavage de la troisième rangée de la plaque **18a**. Par exemple, les cônes sont complètement vidés du premier tampon de lavage, puis un second lavage identique au premier lavage est réalisé.

- A la suite de ce second lavage, une étape de migration **118** des culots de particules **200** dans les pointes **21** des cônes **20** est mise en œuvre. Pour ce faire, les cônes **20** restent préférentiellement remplis du second tampon de lavage pour faciliter la glisse des culots **200** et restent alignés avec la seconde rangée de la plaque **18a**. L'utilisateur tourne alors une des roues **50** pour faire remonter la pipette **12**. La pièce aimantée **16** étant solidaire du socle **34**, les culots restent donc immobiles par rapport à cette dernière et migrent vers les pointes **21** en glissant sur les parois des cônes **20** à mesure de la remontée de la pipette. L'utilisateur stoppe la remontée de la pipette **12** une fois les culots **200** dans les pointes **21**, comme illustré à la figure 10, à une distance moyenne de quelques millimètres, e.g. 8 mm, des extrémités ouvertes des cônes. Dans cette position, l'utilisateur sélectionne et lance ensuite à l'aide de

l'interface **24** le refoulement du tampon de lavage contenu dans les cônes **20** dans les puits de la plaque **18a**. Optionnellement, une des phases de lavage, ou une phase de lavage supplémentaire consiste à retirer la pièce aimantée de manière à libérer les particules magnétiques et réaliser un lavage tout en brassant les particules dans la solution de lavage par des cycles d'aspiration et de refoulement. Les particules sont ensuite capturées une nouvelle fois en remplaçant la pièce aimantée et en procédant à des cycles d'aspiration et de refoulement tel que décrit précédemment.

La purification **102** se termine par une étape **120** de transfert dans les tubes d'élution PCR **69** des particules magnétiques présentes dans les pointes **21** des cônes **20**. A cet effet, l'utilisateur soulève le porte-pipette **14**, ôte la plaques **18a**, place le portoir magnétique **18b** dans le logement **56** de manière à aligner les tubes PCR **69** avec la rangée de cônes **20**, repose le porte-pipette **14** et retire la pièce aimantée **16** du socle **14** afin de libérer les particules magnétiques capturées des cônes. Une fois les pointes **21** plongées dans les tubes **69**, l'utilisateur sélectionne, à l'aide de l'interface **24**, un quatrième protocole de pipetage, puis lance le protocole sélectionné. Une première variante de ce protocole consiste en des cycles d'aspiration et de refoulement du tampon d'élution dans les pointes **21** des cônes **20**, ce qui permet la remise en suspension des particules magnétiques en cassant les culots de particules. Par ailleurs, la fréquence choisie pour les cycles permet, à chaque refoulement dans les tubes **69**, à une parties des particules magnétiques d'être capturées dans les tubes **69** grâce au champ magnétique de la pièce aimantée **68** logée dans le portoir **64**. De plus ces cycles permettent de « rincer » les pointes **21** pour récupérer des particules adhérant aux parois des cônes. Dans une deuxième variante du protocole, des cycles d'aspiration et de refoulement sont tout d'abord mis en œuvre à une fréquence plus élevée de façon à brasser plus vigoureusement le tampon et les particules, et donc d'obtenir une homogénéisation accélérée facilitant le transfert dans les tubes d'élution **69**. L'étape de transfert se termine par le refoulement complet du tampon d'élution dans les tubes **69**. Sous l'effet du champ magnétique du portoir **64**, les particules magnétiques sont alors définitivement séparées du tampon d'élution, comme illustré à la figure 11. L'utilisateur peut ainsi récupérer les tubes **69** pour un traitement ultérieur, en particulier l'élution des acides nucléiques par chauffage, d'une manière connue en soi.

Dans le mode de réalisation du porte-pipette décrit précédemment, la pièce aimantée **16** est logée dans le socle **34**. Aussi, lorsque l'utilisateur souhaite avancer la plaque **18a**, il peut remonter la pipette suffisamment haut pour procéder à cette opération. Ceci provoque, comme pour la migration des particules vers les pointes, le déplacement des culots **200** sur les parois des cônes **20**, ce qui présente l'avantage de « réorganiser » les culots qui peuvent rouler sur eux-mêmes. L'efficacité du lavage s'en trouve ainsi renforcée. Par contre, cela implique que

l'utilisateur prend garde à ne jamais trop remonter la pipette afin d'éviter que les culots sortent des cônes. Pour ce faire, l'utilisateur peut par exemple soulever ou basculer le porte pipette pour conserver les culots à distance des ouvertures des cônes. Cette option, qui nécessite le soulèvement répété d'un dispositif dont le poids peut être important, peut cependant entraîner à long terme des troubles musculo-squelettiques. En outre, l'utilisateur doit encore prendre garde de ne pas trop soulever le porte-pipette afin d'éviter que les culots sorte des cônes.

Une second mode de réalisation du porte-pipette selon l'invention permet la manipulation des plaques **18a**, **18b** en remontant uniquement la pipette, et donc en évitant de soulever le porte-pipette **14**, tout en garantissant que les culots de particules restent à distance des pointes **21** des cônes. Ce second mode de réalisation, ainsi que les variations induites sur le procédé venant d'être décrit, sont illustrés aux figures 12 et 13.

Plus particulièrement, le second mode de réalisation diffère du premier mode de réalisation par les moyens de réception de la pièce aimantée **16** dans le porte-pipette **14**. Notamment, le socle **34** comprend le logement **78** pour l'insertion et le retrait de la pièce aimantée **16** comme décrit précédemment et le logement **78** est ouvert dans sa partie supérieure **130** pour permettre également l'insertion et le retrait de la pièce **16** verticalement dans le logement **78**. Le support de pipette **36** comprend en outre des moyens pour fixer la pièce aimantée **16** à l'aplomb du logement ouvert **78**, en particulier un ou plusieurs plots **132** en matériau aimantable (e.g. en acier) fixés sur une paroi arrière **134** du support de pipette mobile **36** (figure 12C). De cette manière, la pièce aimantée **16** est solidaire du support mobile **36**, et reste en face des cônes **20** lorsque l'utilisateur remonte et descend la pipette (en particulier lors des phases de lavage), comme illustrée aux figures 12B à 13A.

Pour réaliser la migration des culots **200** dans les pointes des cônes **20**, l'utilisateur désolidarise la pièce aimantée **16** du support de pipette **36**, en appliquant en simple pression vers le bas sur la poignée **78** de la pièce **16** et remonte la pipette **12**. La pièce aimantée **16** se détache des plots **134**, reste donc dans le logement **78** du socle et est donc solidaire du socle **34**, induisant la migration des culots **200** dans les pointes **21** des cônes comme décrit précédemment (figures 13A et 13B). Une fois la pipette remontée, l'utilisateur remplace la plaque **18a** par le portoir **18b** muni des tubes d'élution PCR, retire la pièce aimantée **16** et redescende la pipette (figure 13C, tubes **69** non représentés). En variante, le support de pipette **36** peut comporter un logement analogue au logement **78** du socle dans lequel l'utilisateur glisse la pièce aimantée notamment pour les phases de lavage.

Il a été décrit un procédé d'extraction particulier. La présente invention s'applique cependant à tout type de capture de particules magnétiques et à tout type de séquence de pipetage. De même, il a été décrit une pipette ayant 8 canaux d'un volume particulier. La pipette peut comprendre un nombre quelconques de canaux de volume quelconque en fonction de l'application visée.

Afin d'augmenter le nombre d'échantillons traités, deux systèmes d'extraction selon l'invention peuvent être couplés, comme illustré à la figure 14. Par exemple, les poignées de rotation **50** peuvent s'emboîter de sorte que deux extractions peuvent être menées simultanément, l'utilisateur remontant et descendant les pipettes **12** en même temps. A cette fin, les pipettes peuvent également être synchronisées, une pipette commandant par exemple l'autre pipette.

De même, il a été décrit un système d'extraction portable et semi-automatisé, particulièrement adapté aux laboratoires d'analyse ayant un nombre limité d'extractions à réaliser au quotidien. L'invention peut cependant être automatisée. Par exemple, la pipette est intégré à un automate qui comprend des mécanismes programmables de montée et de descente de la pipette et de mouvement d'aimant (ou d'activation/désactivation d'électroaimants).

Il a été décrit deux lavages dans les puits de la deuxième rangée et de la troisième rangée de la microplaque **18a**. Le nombre de lavage peut être cependant être quelconque. De même, il a été décrit une seule étape de capture des particules dans les cônes. Une ou plusieurs étapes de libération des particules, chacune suivie d'une nouvelle étape de capture, peuvent être également prévues.

Pour libérer les particules, le champ magnétique de capture des particules est désactivé en retirant la pièce aimantée **16** de son logement, puis des cycles d'aspiration/refoulement d'un tampon est réalisé dans les cônes de pipette de manière à détacher les culots de particules des parois des cônes et les désagréger. Une telle procédure prend plus de 10 minutes pour détacher complètement les culots des parois des cônes avec une fréquence d'aspiration/refoulement (aspiration et refoulement complet dans les cônes) de 5 cycles par minutes. En se référant à la figure 15, une libération plus rapide d'un culot **200** est obtenue en réalisant un mouvement de va-et-vient, sur le culot **200**, du ménisque **300** que forme le tampon **302** dans un cône **20**. Notamment, le cycle d'aspiration/refoulement est réglé de sorte que le ménisque **300** réalise une course limitée **304** de part et d'autre du culot **200** afin d'augmenter la fréquence de passage du ménisque sur le culot. De même, la fréquence des cycles d'aspiration /refoulement est accrue pour augmenter encore ladite fréquence de passage, en particulier une fréquence cycle supérieure à 2 cycles par secondes sur la zone de présence

du culot de particules magnétiques. En appliquant cette procédure, les culots se détachent des cônes en moins de 1 minute. Les inventeurs ont constaté que c'est le passage du ménisque sur un culot qui aide à détacher ce dernier. En effet, des essais ont été menés en brassant rapidement le tampon dans les cônes dans faire passer les ménisques sur les culots (i.e. « simple » mouvement de liquide devant les culots) sans gain notable de temps. Une fois la phase de libération des culots réalisée, qui a également pour effet de désagréger les culots, une phase de brassage par aspiration/refoulement complet dans les cônes est mise en œuvre (e.g. 8 cycles d'aspiration/refoulement par minute) pour terminer de désagréger les culots et homogénéiser le tampon comprenant les particules. Ces cycles d'aspiration/refoulement complets dans les puits de la microplaques brassent un plus grand volume, sur une plus grande course, ce qui facilite l'homogénéisation du tampon.

Il va à présent être décrit un procédé privilégié d'extraction d'acides nucléiques (e.g. ADN et ARN), en particulier d'origine virale, par exemple à l'aide de particules de silice magnétiques. Ce procédé comprend une phase de libération des particules, e.g. telle que décrite précédemment, suivie d'une phase de lavage dans un tampon et de recapture des particules. Un gain notable de temps est obtenu ainsi qu'une extraction améliorée. En particulier, ce procédé comprend, une fois l'étape de lyse des virus effectuée :

1. une première étape de capture des particules magnétiques dans les cônes de pipette, e.g. de la manière décrite précédemment ;
2. suivi d'une première étape de lavage, et de préférence d'au moins une seconde étape de lavage, dans des rangées différentes de la microplaque remplies de tampon de lavage (e.g. le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°1 » de bioMérieux de référence 280130). Chaque lavage comprend des cycles d'aspiration /refoulement du tampon de lavage avec les particules capturées sur les cônes de pipette, et dure au moins 15 secondes, de préférence entre 25 secondes et 35 secondes, par exemple 30 secondes, et de préférence moins d'une minute ;
3. au moins une troisième étape de lavage dans une troisième rangée de la microplaque **18a** remplie d'un tampon de lavage (e.g. le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°2 » de bioMérieux de référence bMx 280131). Lors de cette troisième étape de lavage, les particules sont libérées en retirant l'aimant, de manière à remettre les particules en suspension, le tampon avec les particules en suspension étant aspiré/refoulé dans les puits correspondant de la microplaque **18a**. La troisième étape de lavage, de préférence comprenant une phase de passage de ménisques sur les culots telle que décrite précédemment dure quelques minutes, notamment 5 minutes ;
4. une deuxième étape de capture des particules sur les cônes de pipette, e.g. telle que décrite précédemment ;

5. optionnellement une quatrième étape de lavage, les particules étant capturées, dans une troisième rangée de la microplaque **18a** remplie d'un tampon de lavage (e.gle « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°2 » de bioMérieux de référence bMx 280131) ;

6. une étape de migration des culots de particules dans les pointes, suivie d'une étape de transfert dans des tubes (e.g comprenant un tampon d'élution, par exemple le « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°3 » de bioMérieux, de référence 280132), e.g. tel que décrit précédemment.

Il a été décrit des tampons de lavage de la gamme NucliSens, en particulier des tampons d'extraction n°1, n°2 et n°3. Plus généralement :

- le tampon d'extraction n°1 est un tampon favorisant la capture des acides nucléiques sur la silice en créant des ponts entre les groupes silanols de la silice et les groupes phosphates des acides nucléiques. Il comprend par exemple du guanidinium thiocyanate, à savoir un agent chaotrope tel que décrit dans le document de R. Boom et al. "*Rapid and simple method for purification of nucleic acids.*" Journal of Clinical Microbiology. 1989; 28 (3): 495-503 ;
- les premier et second lavages permettent d'éliminer les débris résiduels de matrice ou de micro-organismes,
- le troisième et quatrième lavages permettent d'éliminer les traces de GuSCN et des inhibiteurs d'une amplification de type PCR usuellement mise en place ultérieurement sur l'ADN/ARN capturé par les particules magnétiques.
- le tampon d'élution compris dans les cônes PCR permet d'enlever toute trace de tampon de lavage et d'être dans les conditions optimales pour l'étape d'élution

Le tableau suivant compare les résultats obtenus avec le dispositif selon l'invention en appliquant le protocole venant d'être décrit (2 premiers lavage suivi d'un troisième lavage avec libération des particules) en comparaison des résultats obtenus avec un dispositif de l'état de la technique, à savoir le MiniMag® commercialisé par bioMérieux et considéré comme un dispositif de référence dans l'extraction d'ARN viral. Le protocole pour le MiniMag® comprend quatre étapes de lavage avec les tampons de lavage (deux avec le tampon « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°1 » et deux avec le tampon « NucliSENS easyMAG Extraction Buffer n°2 »). Pour déterminer l'efficacité de l'extraction, une amplification PCR en temps réel (ou « q-PCR ») du lysat extrait est mise en œuvre et le Ct (« cycle threshold », qui quantifie un seuil de détection d'acide nucléique dans un échantillon) de chaque échantillon mesuré. Les échantillons testés en duplica sont des échantillon de 25 grammes de framboise ou d'oignon vert auquel sont ajoutés une solution de Mengo virus pure (correspondant à 500 copie du génome par 25 gramme) ou diluée à 1/10°.

Echantillon		Invention (valeur de Ct)				MiniMag® (valeur de Ct)	
		framboise		Oignon vert		Framboise	Oignon vert
Mengo	pur	25,72	26,29	25,87	25,55	24,86	25,06
	1/10	27,87	28,61	28,06	27,95	28,01	27,81
Mengo	pur	26,05	26,11	25,82	25,87	24,93	24,99
	1/10	28,23	28,44	27,59	28,13	28,06	27,76

Comme on peut le constater, l'extraction de l'ARN viral selon l'invention donne des résultats similaires avec ceux obtenus à l'aide du MiniMag®. En outre, des tests ont été menés avec des différents lots de particules de silice magnétiques de qualité diverse. Il a été constaté que l'extraction selon l'invention est étonnamment très robuste vis-à-vis de la qualité desdites particules. En particulier, des tests ont été réalisés sur les même échantillons avec un lot de particules de moindre performance, l'extraction ne comportant pas l'étape de libération/lavage/recapture telle que décrite précédemment. Dans ce cas, le taux d'extraction était plus faible. En utilisant le procédé préféré décrit précédemment avec les particules défectueuses, des résultats similaires à ceux de la table précédente ont été obtenus.

Il a été décrit une application de l'invention à la capture d'acides nucléiques, e.g. ARN et/ou ADN provenant d'une lyse réalisée préalablement aux phases de capture/lavage/migration et transfert. L'invention s'applique également à la capture de microorganismes (e.g. bactéries, champignons, levures) à l'aide de particules magnétiques dont la surface est fonctionnalisée pour capturer les microorganismes (e.g. recouvertes de protéines de phage ou de polycations aptes à une telle capture d'une manière connue en soi). Les particules magnétiques avec leur microorganismes capturés sont transférées dans des tubes pour subir ensuite une lyse, par exemple mécanique. Le lysat obtenu peut directement faire l'objet d'un traitement, par exemple une amplification par réaction en chaîne par polymérase (e.g. une PCR quantitative de type q-PCR), ou être purifié selon le procédé d'extraction d'acides nucléiques décrit précédemment.

L'invention est particulièrement adaptée à la préparation d'échantillon microbien en vue d'une PCR. En effet, l'échantillon sur lequel est réalisé la capture de particules dans les cônes de pipette peut être de très grand volume (e.g. plusieurs millilitres) alors que le volume final des tubes dans lesquelles les particules sont transférées peuvent de très faible volume (e.g. inférieur ou égal à 200 microlitres, voire inférieur ou égal à 100 microlitres). En raison du

grand volume de l'échantillon, un nombre important de microorganisme est capturé. Le passage à un très faible volume final a pour effet de concentrer les microorganisme. Ainsi, les inventeurs ont noté qu'une seule phase de capture depuis un échantillon de quelques millilitres suivie d'une seule étape de lavage, est suffisant pour obtenir des résultats par q-PCR à partir d'une lyse réalisée dans un volume de 5 microlitres.

Notamment, un enrichissement de matrice alimentaire (aiguillette de poulet) en bouillon nutritif a été réalisé pendant 5h à 41,5°C. Un post-contamination avec une souche *Salmonella Derby* est réalisé à un niveau de 10^2 à 10^4 CFU/mL, ce qui correspond à des concentrations pouvant être atteintes après enrichissement en présence de pathogène dans la matrice alimentaire (i.e. des concentrations pour lesquelles un lot alimentaire est déterminé comme impropre à la consommation). Sur chaque échantillon contaminé, il est mise en œuvre, en duplica, deux procédures, une selon le protocole standardisé de capture avec le système Gene-up® de bioMérieux, France, et une selon l'invention.

Le protocole du Gene-up consiste en une étape de « bead-beating » de l'échantillon (i.e. disruption mécanique de la paroi des bactéries), en prélevant 20 µL de celui-ci que l'on met dans un tube de bead-beating contenant 180 µL de tampon de lavage, suivi de l'agitation pendant 5 minutes sur agitateur de microplaques pour bead-beating. 5 microlitres de la solution final sont prélevés puis font l'objet d'une q-PCR.

Le procédé selon l'invention consiste quant à lui en :

1. une étape de capture spécifique en mettant en contact 2 mL d'échantillon avec une solution de protéine de phage biotinylée (2 µg/mL finale) par :
 - a. agitation par aspiration/refoulement dans les cônes de la pipette pendant 10 min.
 - b. ajout de particules magnétiques « Hyglos Streptavidin » (50 µL) et agitation par aspiration/refoulement pendant 15 minutes (les complexes bactéries-protéines de phage biotinylées viennent se fixer sur les particules magnétiques) ;
 - c. mise en place de l'aimant pour la phase de collecte des particules magnétiques dans les cônes ;
 - d. lancement du cycle de capture des particules magnétiques ;
2. une étape de lavage en dans les puits contenant la solution de lavage TST (Tris Saline Tween) avec 5 cycles d'aspiration/refoulement ;
3. étape de collecte des particules magnétiques dans des tubes de 5 microlitres qui font l'objet d'un traitement de bead-Beating, la solution finale de 5 microlitres faisant ensuite l'objet d'une q-PCR.

Les résultats obtenus selon le protocole du Gene-up® et selon l'invention sont résumés dans la table ci-dessous:

Concentration	Invention (valeur de Ct)	Gene-up® (valeur de Ct)
10 ² CFU/ml	35,2	Pas de Ct
	35	Pas de Ct
10 ³ CFU/ml	33,8	Pas de Ct
	33,8	Pas de Ct
10 ⁴ CFU/ml	29,5	34,9
	29,7	Pas de Ct

- 5 Le gain de sensibilité estimé est de 2 log par rapport au protocole standard Gene-UP.

La présente invention répond à une problématique de polyvalence pour l'utilisation de différentes techniques de capture magnétique (purification des acides nucléiques, Immuno-concentration magnétiques,...). Le système selon l'invention, évolutif et modulable, permet :

- 10 - la réalisation d'étapes de capture/lavage/élution de particules magnétiques en utilisant un système autonome constitué par l'association d'une pipette électronique programmable et d'un support permettant la réalisation des différentes étapes précitées ;
- le traitement d'un nombre d'échantillon de 1 à 8 en fonction de la configuration de la pipette électronique utilisée ;
- 15 - la parallélisation du traitement des échantillons dans le cadre défini ci-dessus avec un système semi-automatique ;
- l'association de 2 systèmes si besoin d'augmenter le nombre d'échantillon à traiter ;
- les étapes d'élution peuvent être réalisées dans différents types de tubes : tubes PCR 0.2 mL pour récupération des particules de silice magnétiques lorsqu'il s'agit de capture des
- 20 acides nucléiques (e.g. chimie NucliSENS®) ou bien tubes de bead-beating dans le cas de la récupération de particules magnétiques ayant servi à la récupération de pathogènes (Immuno-Concentration Magnétique). A cette fin, le système permet la réalisation d'étapes de capture/concentration des pathogènes sur les particules magnétiques et leur lyse in-situ à l'aide de billes de céramique / verre (e.g. procédé de type CapLyse®).

REVENDICATIONS

1. Procédé d'extraction de composants contenus dans un échantillon biologique sous forme liquide, lesdits composants étant aptes à se fixer sur des particules magnétiques, le procédé comprenant :
- une phase (106) de mélange de l'échantillon avec les particules magnétiques;
 - une phase (110) d'aspiration du mélange depuis un puits dans un cône de pipette (20) tubulaire comprenant une pointe (21) destinée au pipetage de liquide;
 - une phase de capture (112) des particules magnétiques sur une paroi interne du cône de pipette (20) :
 - o en appliquant un premier champ magnétique (16) au cône de pipette (20), ledit champ étant apte à attirer et maintenir les particules magnétiques dans une zone prédéterminée du cône de pipette (20), dite de « capture », au-dessus de la pointe de celui-ci ;
 - o et en appliquant au moins un cycle d'aspiration et de refoulement du mélange contenu dans le cône de pipette (20) dans un puits (62);
 - au moins une phase (114, 116) de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette (20) en :
 - o refoulant le mélange contenu dans le cône de pipette (20) ; et
 - o en appliquant depuis un puits (62) contenant une solution de lavage au moins un cycle d'aspiration et de refoulement de la solution de lavage dans le cône de pipette (20) ;
 - une phase (118) de migration des particules magnétiques sur la paroi interne du cône de pipette (20), depuis la zone de capture jusqu'à la pointe (21) du cône de pipette (20), en réalisant un déplacement relatif du cône de pipette (20) par rapport au premier champ magnétique (16) ;
 - et une phase (120) de transfert desdites particules magnétiques ayant migré dans la pointe (21) du cône de pipette (20) dans un puits de récupération (69) contenant une solution.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le déplacement du premier champ magnétique (16) consiste à déplacer le cône de pipette (20) parallèlement à un axe longitudinal (X) dudit cône (20), et à conserver constant le premier champ magnétique (16), l'axe longitudinal (X) du cône de pipette restant à égale distance du premier champ magnétique (16) lors du déplacement du cône de pipette (20).
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la phase (120) de transfert comprend :

- le placement de la pointe (21) du cône de pipette (20) dans le puits de récupération (69);
- et l'application d'un second champ magnétique (68) depuis le fond du puits de récupération (69) de manière à faire migrer dans le puits de récupération (69) les particules magnétiques contenues dans la pointe (21) du cône de pipette (20).

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le second champ magnétique (68) est produit par un aimant positionné partiellement ou entièrement sous la pointe du cône de pipette.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel le premier champ magnétique appliqué au cône de pipette est désactivé lors de l'application du second champ magnétique.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel la phase (120) de transfert comporte la désactivation du premier champ magnétique (16) suivie de l'application de cycles d'aspiration et de refoulement de la solution du puits de récupération (69) dans la pointe (21) du cône de pipette, ladite application comprenant :

- une première phase d'application des cycles à une première fréquence ;
- suivie d'une deuxième phase d'application des cycles à une deuxième fréquence, inférieure à la première fréquence.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant, préalablement à la phase (112) de capture, une phase de brassage du mélange contenu dans le cône de pipette par l'application d'au moins un cycle d'aspiration et de refoulement dudit mélange dans le cône de pipette.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant, préalablement à la phase (120) de transfert, au moins une phase de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette en :

- a. en désactivant le champ magnétique ;
- b. libérant les particules capturées en appliquant depuis un puits contenant une solution de lavage au moins un cycle d'aspiration et de refoulement de la solution de lavage dans le cône de pipette ;
- c. en appliquant une deuxième phase de capture sur une paroi interne du cône de pipette :
 - en appliquant le premier champ magnétique au cône de pipette

- et en appliquant au moins un cycle d'aspiration et de refoulement du mélange contenu dans le cône de pipette dans le puits contenant la solution de lavage.

- 5 **9.** Procédé selon la revendication 8, dans lequel la libération des particules capturées comprend une phase d'application des cycles de manière à réaliser un va-et-vient d'un ménisque de ladite solution sur un culot de particules capturées dans le cône de pipette, ledit va-et-vient dudit ménisque étant réalisé sur une portion du cône inférieure à la longueur totale du cône de pipette.
- 10 **10.** Procédé selon la revendication 9, dans lequel la libération des particules capturées comprend une deuxième phase d'application des cycles de manière à aspirer et refouler totalement la solution de lavage du cône.
- 15 **11.** Procédé selon la revendication 10, dans lequel la fréquence d'application des cycles de la deuxième phase est inférieure à la fréquence d'application des cycles de la première phase.
- 12.** Procédé selon l'une des revendications 8 à 11, dans lequel préalablement à la libération des particules capturées au moins deux phases de lavage mises en œuvre dans deux solutions de lavage distinctes.
- 20 **13.** Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, dans lequel les composants contenus dans l'échantillon biologique sont des acides nucléiques.
- 25 **14.** Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel les composants contenus dans l'échantillon biologique sont microorganismes, et dans lequel le procédé comprend une unique phase de capture et une unique phase de lavage.
- 30 **15.** Procédé selon la revendication 14, dans lequel mélange de l'échantillon avec les particules magnétiques a un volume supérieur à 1 millilitre, et de préférence supérieur ou égal à 2 millilitres, et dans lequel le volume du puits de récupération est inférieur à 200 microlitres, et de préférence inférieur ou égal à 100 microlitres.
- 35 **16.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant, préalablement à la phase (120) de transfert, au moins une phase de lavage des particules capturées sur la paroi interne du cône de pipette en :
- en aspirant de la solution de lavage dans ledit cône de pipette ;

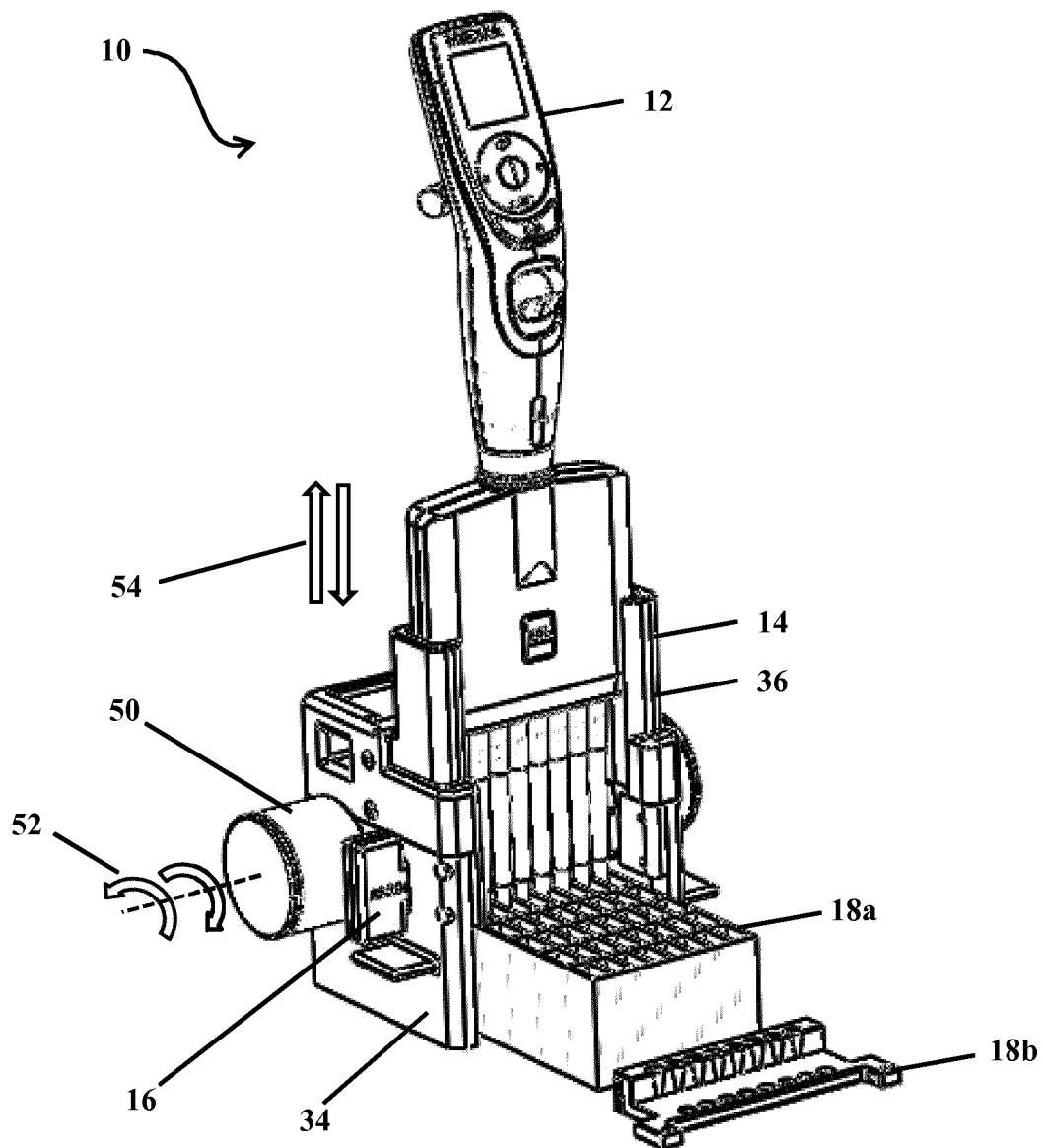
- puis en modulant le premier champ magnétique appliqué aux particules magnétiques pour capturer celles-ci sur la paroi interne du cône de pipette ;
- puis en refoulant le liquide de lavage du cône de pipette.

- 5 **17.** Procédé selon la revendication 16, dans lequel la modulation du premier champ magnétique est réalisé :
- en déplaçant le cône de pipette parallèlement à un axe longitudinal dudit cône, et en conservant constant le premier champ magnétique ;
 - et/ou en faisant défiler des aimants espacés les uns des autres devant les particules
- 10 capturées.
- 18.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le volume du cône de pipette est au moins dix fois supérieur au volume du puits de récupération.
- 15 **19.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le volume du mélange est au moins trois fois supérieur au volume du cône de pipette.
- 20.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les composants appartiennent au groupe formé des acides nucléiques, des microorganismes, des protéines, et des peptides.
- 20
- 21.** Porte-pipette (14) comprenant :
- un socle (34) ;
 - un évidement (56) formé dans le socle (34) et apte à loger de manière amovible un
- 25 support de puits (18a, 18b) ;
- un support de pipette (36) comprenant un premier logement (38) dans lequel est apte à être insérée une pipette (12) équipée d'au moins un cône de pipette tubulaire (20) comprenant une pointe (21) destinée au pipetage de liquide, le premier logement (38) étant ouvert sur l'évidement (56) du socle, le support de
- 30 pipette (36) étant mobile en translation par rapport au socle (34) selon une direction parallèle à un axe (X) des cônes de pipette (20) et mobile entre une première position dans laquelle la pointe (21) de chaque cône de pipette est logée dans un puits (62, 69) du support de puits (18a, 18b) et au moins une deuxième position dans laquelle ladite pointe (21) est en dehors dudit puits (62, 69) ;
- 35
- un second logement (78) apte à loger de manière amovible une pièce aimantée (16), le second logement (78) faisant face à chacun des cônes de pipette (20) dans une position au-dessus de la pointe de celui-ci lorsque le support de pipette (36) est dans la première position, et le second logement (78) faisant face à la pointe du

cône de pipette (20) lorsque le support de pipette (36) est dans la deuxième position.

- 5 **22.** Porte-pipette selon la revendication 21, dans lequel le premier logement (38) comprend une ouverture pour l'insertion et le retrait frontaux de la pipette (12) dans le premier logement (38).
- 10 **23.** Porte-pipette selon la revendication 21 ou 22, dans lequel le second logement (78) est réalisé dans le socle (36).
- 15 **24.** Porte-pipette selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, comprenant un troisième logement dans le support de pipette (36) dans lequel la pièce aimantée (16) est apte à être logée de manière amovible pour faire face à chaque cône de pipette (20) à une position au-dessus de la pointe (21) dudit cône lorsque le support de pipette (36) est dans la deuxième position.
- 20 **25.** Porte-pipette selon la revendication 24, dans lequel le second et troisième logements communiquent, et dans lequel le support de pipette comprend des moyens aptes à maintenir de manière amovible la pièce aimantée dans le troisième logement.
- 25 **26.** Porte-pipette selon l'une quelconque des revendications 21 à 25, dans lequel :
- le socle (34) comprend au moins une roue dentée (42) mobile en rotation ;
- et le support de pipette comprend une crémaillère (40) coopérant avec la roue dentée (42) pour translater le support de pipette (36) par rapport au socle (34) lors de la rotation de la roue dentée.
- 30 **27.** Porte-pipette selon la revendication 26, comprenant un dispositif de verrouillage (et de déverrouillage du support de pipette (82) au moins dans la première position.
- 35 **28.** Porte-pipette selon l'une des revendication 26 ou 27, comprenant au moins une poignée solidaire (50) de la roue dentée pour faire tourner celle-ci et apte à se fixer de manière amovible à une poignée solidaire (50) de la roue dentée d'un autre porte-pipette.
- 35 **29.** Système pour l'extraction de composants contenus dans un échantillon biologique sous forme liquide, lesdits composants étant aptes à se fixer sur des particules magnétiques, le système comprenant :

- une pipette (12) équipée d'au moins un cône de pipette tubulaire (20) comprenant une pointe (21) destinée au pipetage de liquide et d'un circuit d'aspiration et de refoulement dans chaque cône de pipette (20) ;
 - au moins un support de puits (18a, 18b) ;
 - 5 - un porte-pipette (14) comprenant :
 - un socle (34) ;
 - un évidement (56) formé dans le socle (34) et apte à loger de manière amovible chaque support de puits ;
 - 10 ○ un support de pipette (36) comprenant un premier logement (38) dans lequel la pipette (12) est insérée, le premier logement (38) étant ouvert sur l'évidement (56) du socle (34), le support de pipette (36) étant mobile en translation par rapport au socle (34) selon une direction parallèle à un axe (X) des cônes de pipette (12) et mobile entre une première position dans laquelle la pointe (21) de chaque cône de pipette (36) est logée dans un puits (62, 69)
15 du support de puits (18a, 18b) et au moins une deuxième position dans laquelle ladite pointe (21) est en dehors dudit puits (62, 69) ;
 - un second logement (78) faisant face à chacun des cônes de pipette (20) dans une position au-dessus de la pointe (21) de celui-ci lorsque le support de pipette est dans la première position, et le second logement faisant face à la
20 pointe du cône de pipette lorsque le support de pipette est dans la deuxième position ; et
 - une pièce aimantée (16) logée de manière amovible dans le second logement (78).
30. Système selon la revendication 29, dans lequel le porte-pipette est conforme à l'une
25 quelconque des revendications 21 à 28.
31. Support de puits (18b), comprenant une pièce (64) dans laquelle sont formés des évidements (66) pour la réception des puits (69), et au moins un aimant (68) faisant face à chacun des évidements (66) formés dans ladite pièce (64).
- 30

**FIGURE 1**

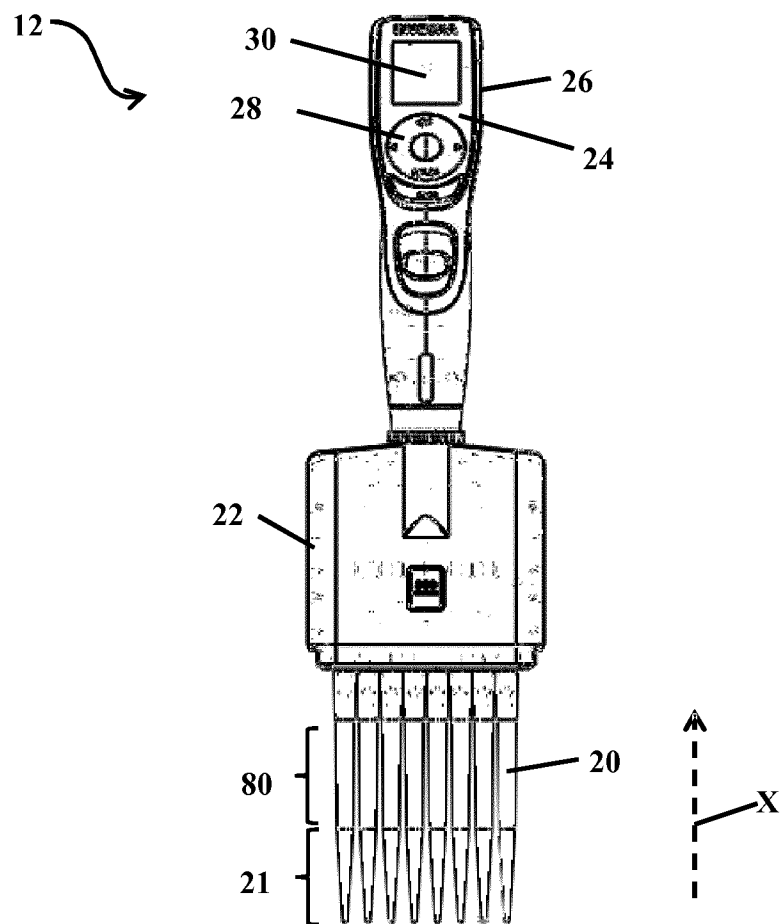


FIGURE 2A

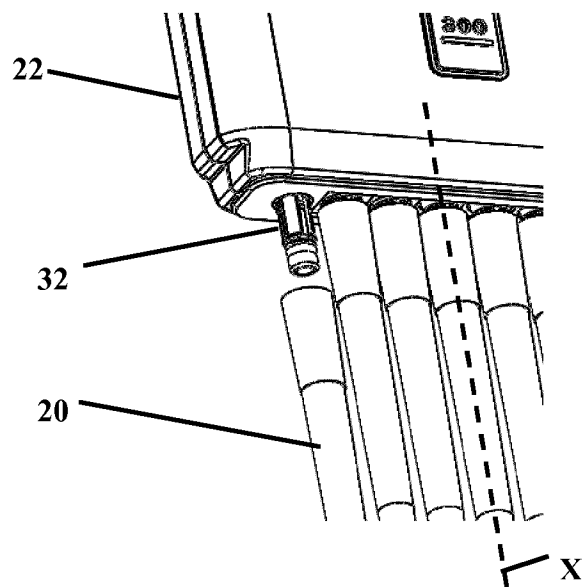


Figure 2B

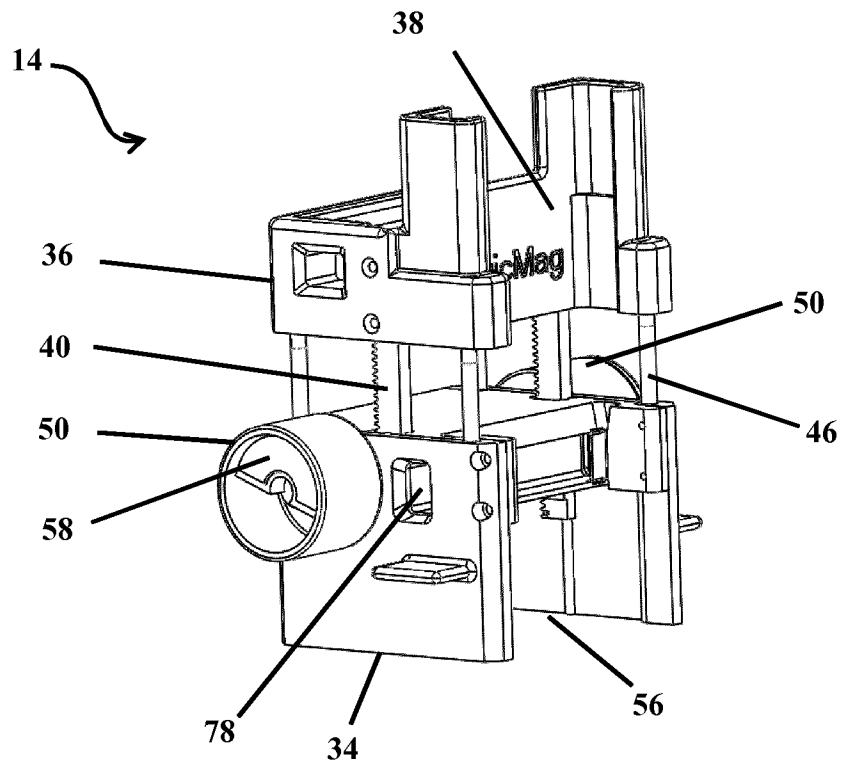


FIGURE 3A

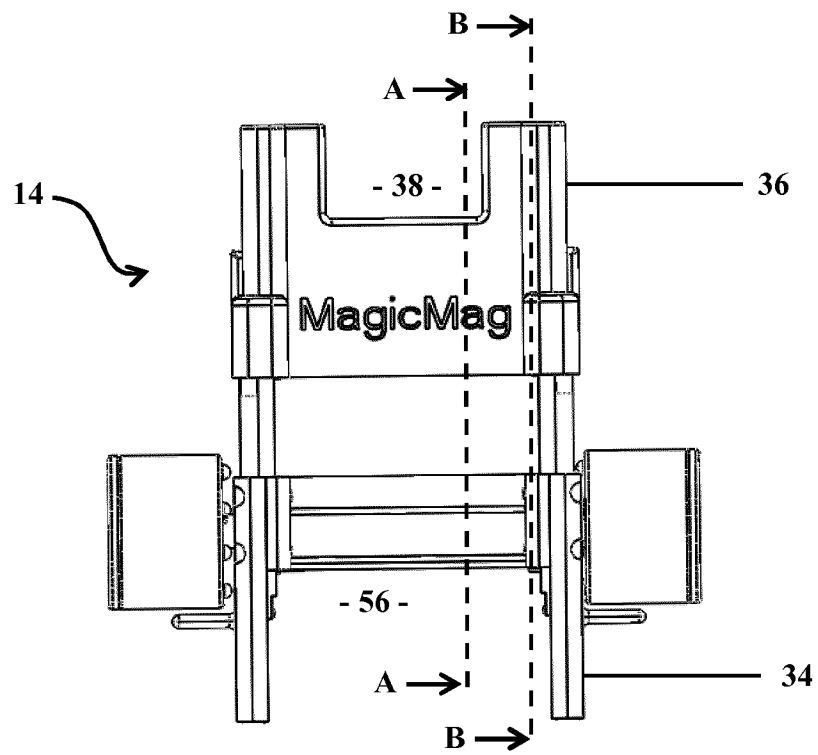


Figure 3B

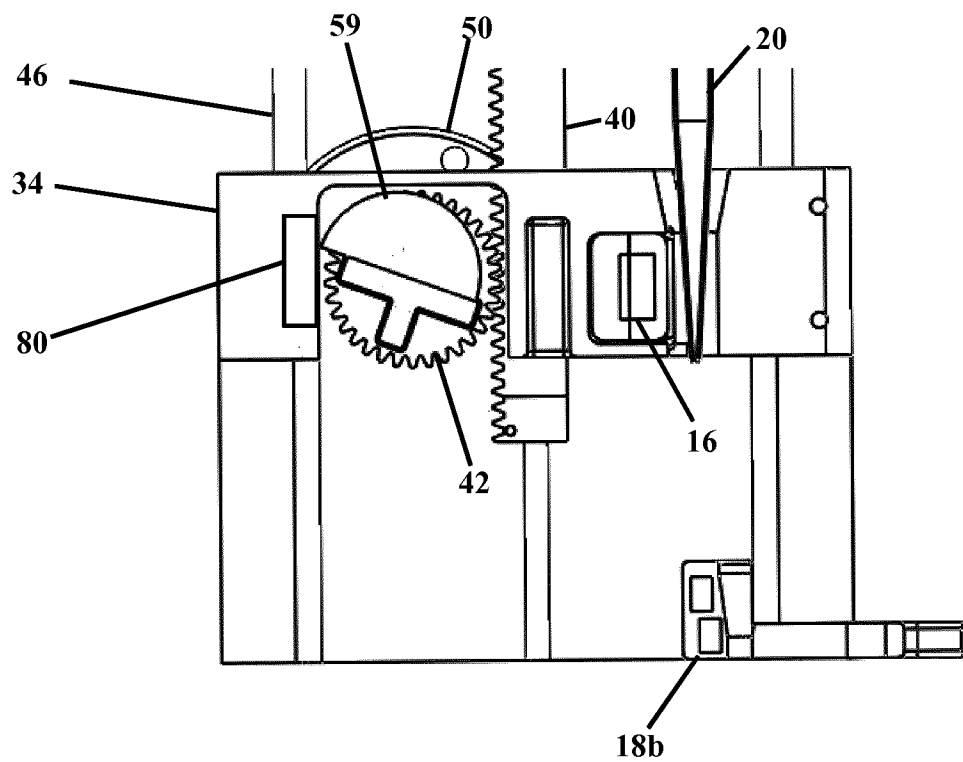


Figure 4A

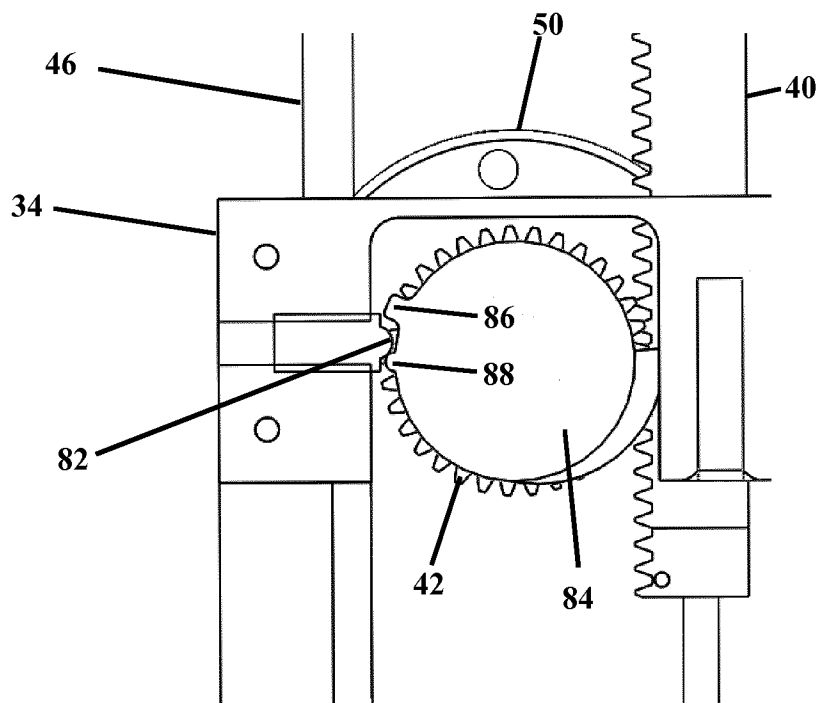


Figure 4B

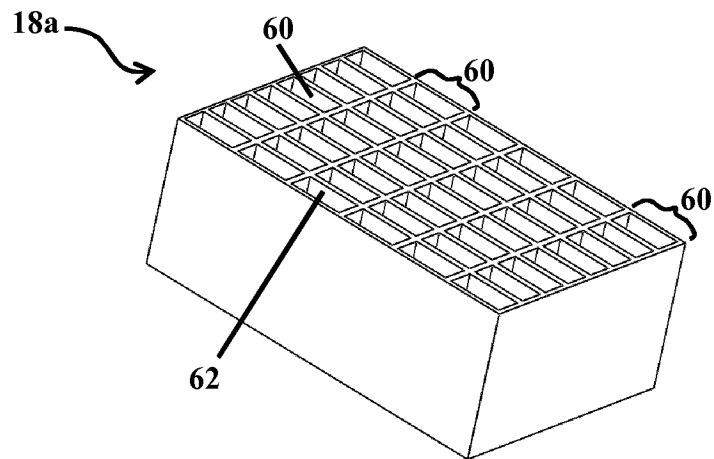


Figure 5

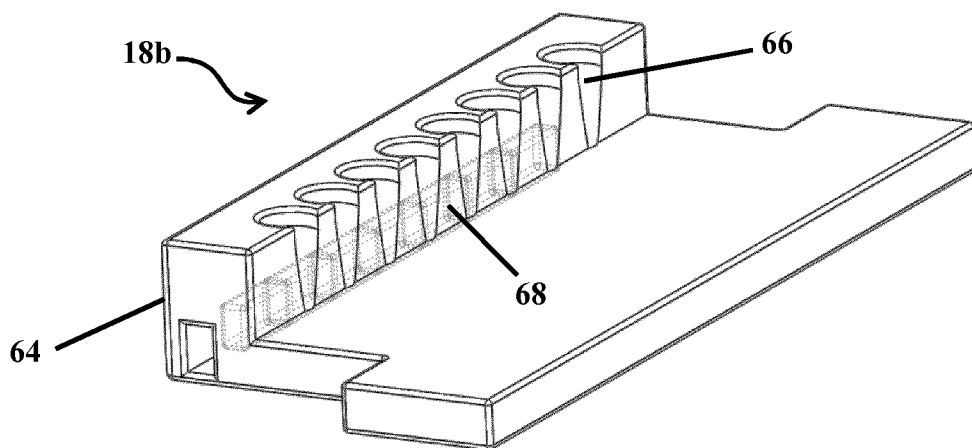


Figure 6A

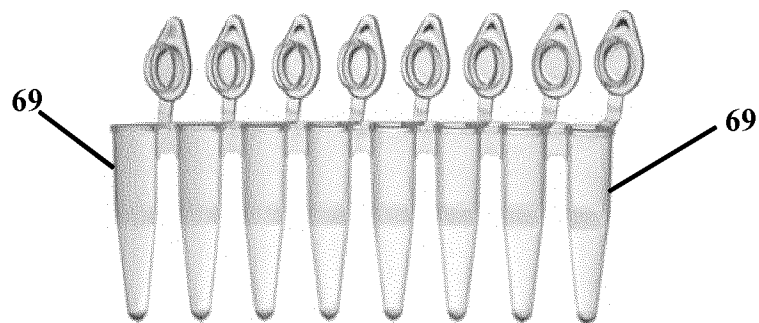


Figure 6B

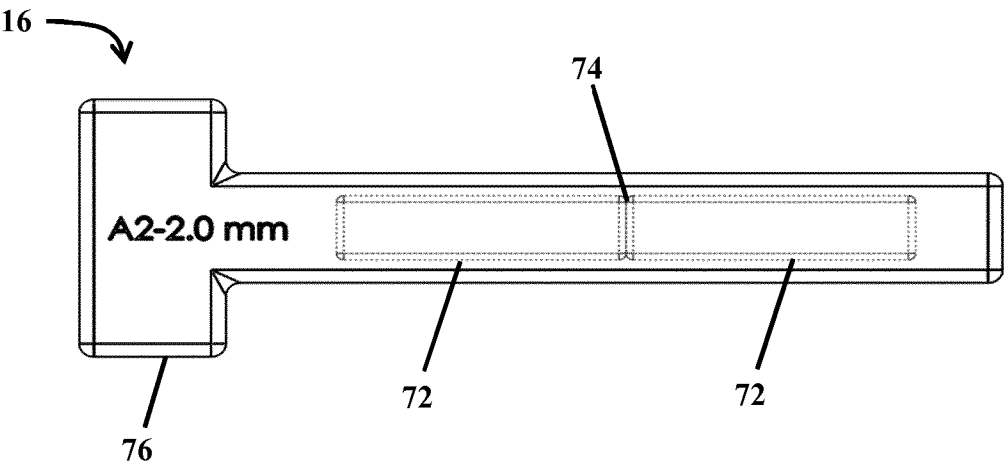


Figure 7

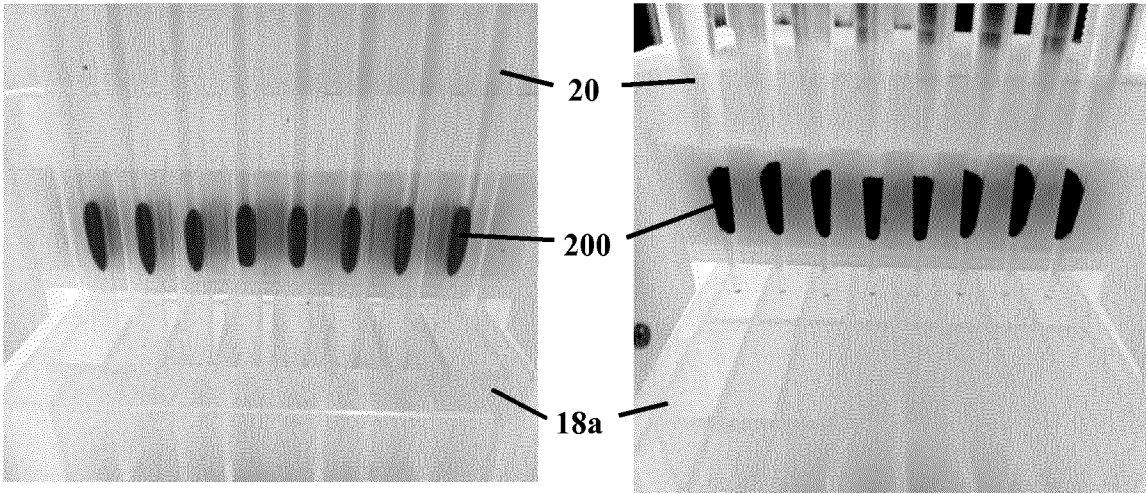


Figure 9

Figure 10

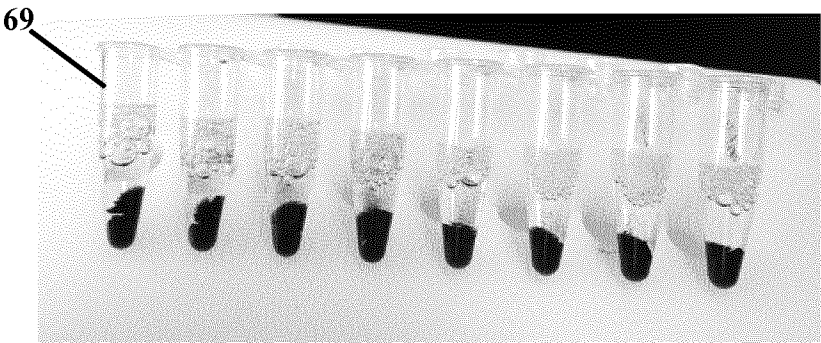
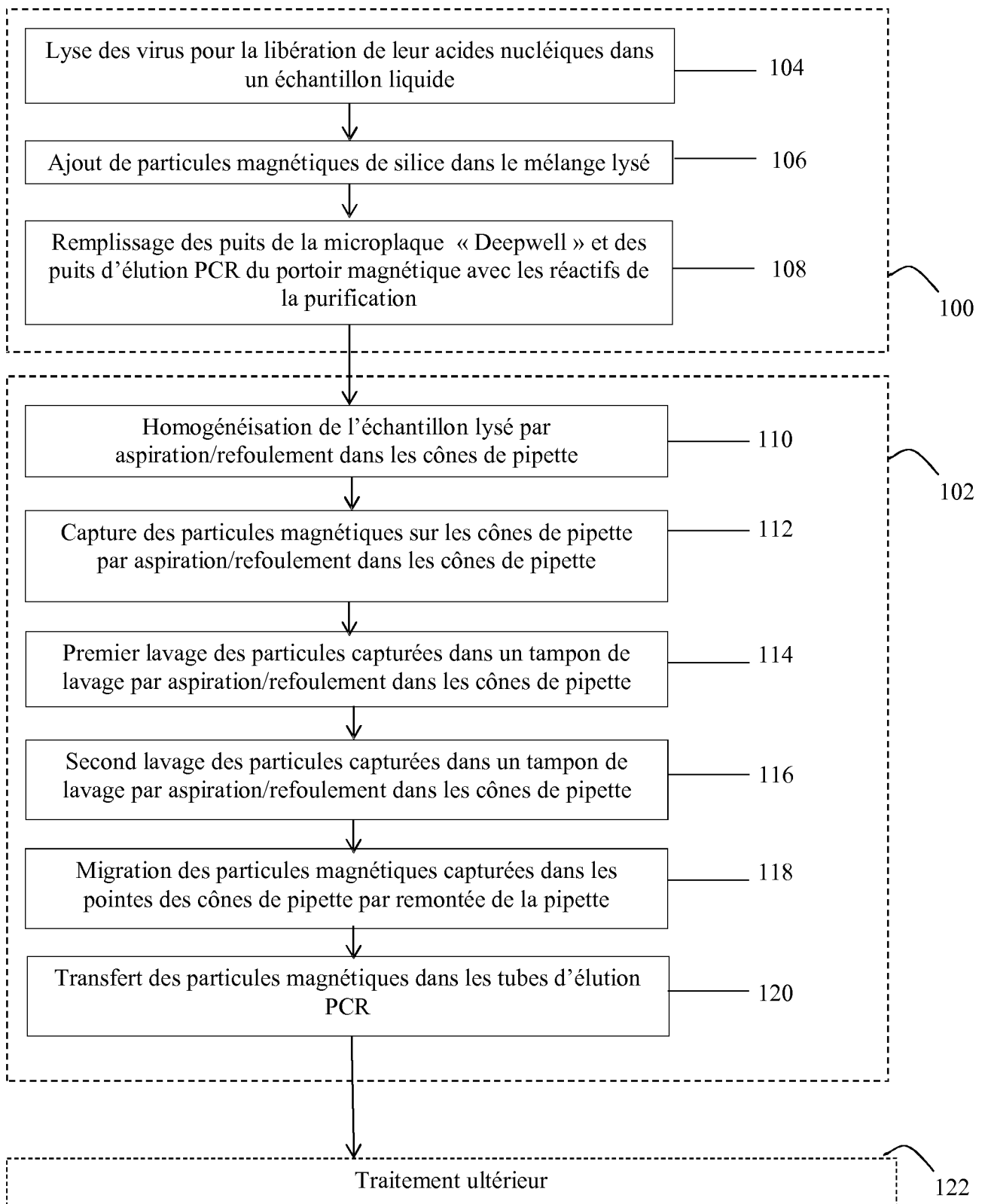


Figure 11

**Figure 8**

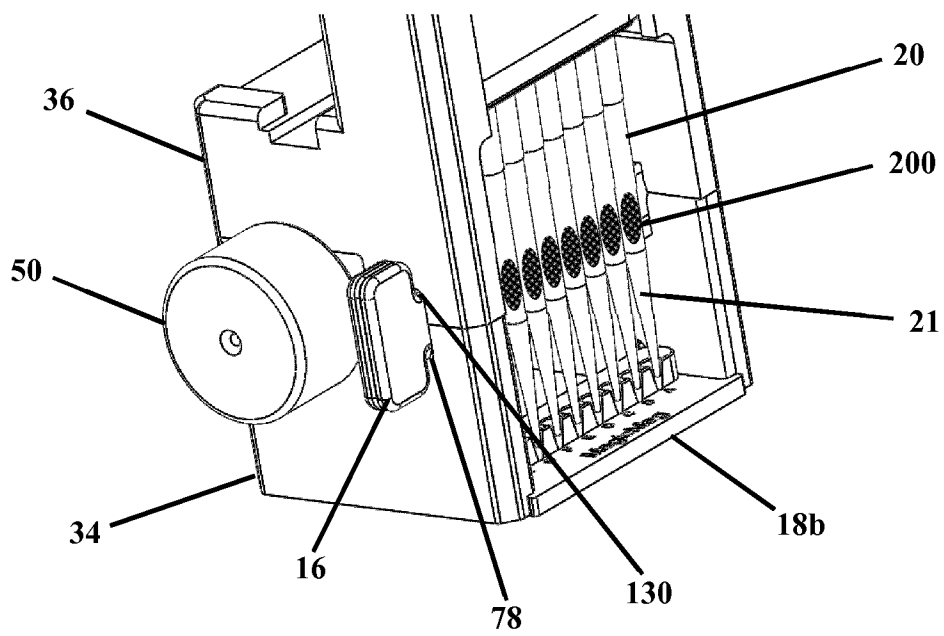


Figure 12A

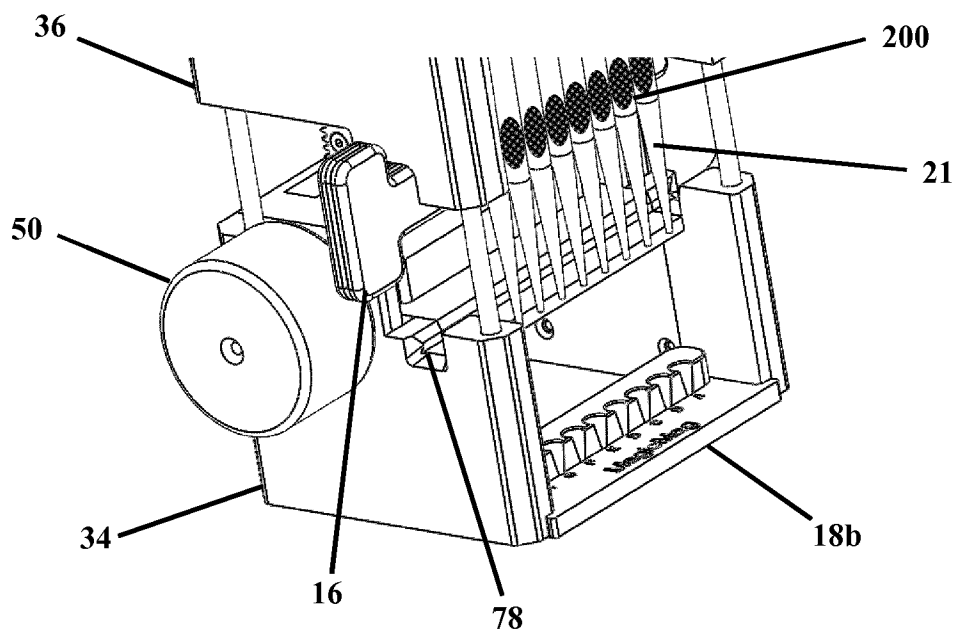


Figure 12B

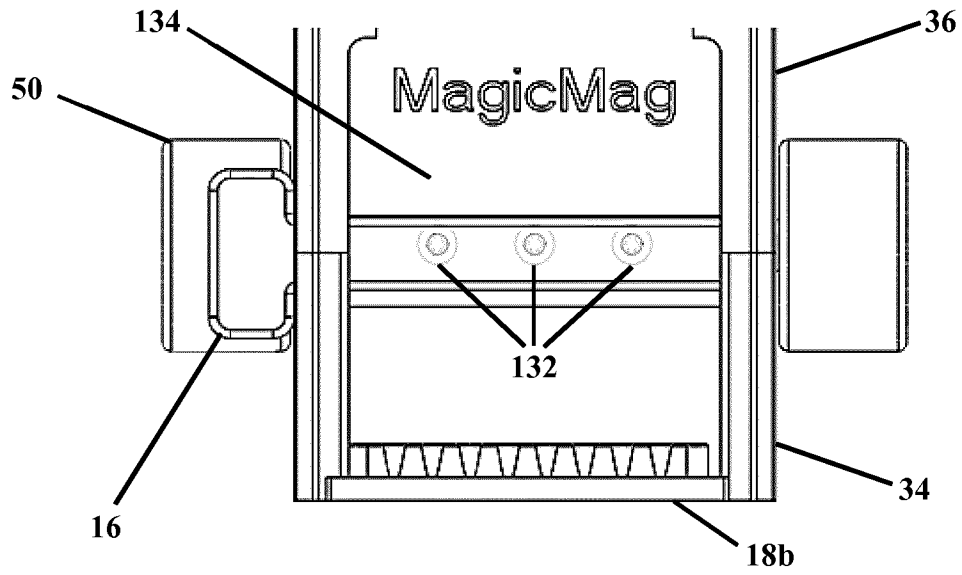


Figure 12C

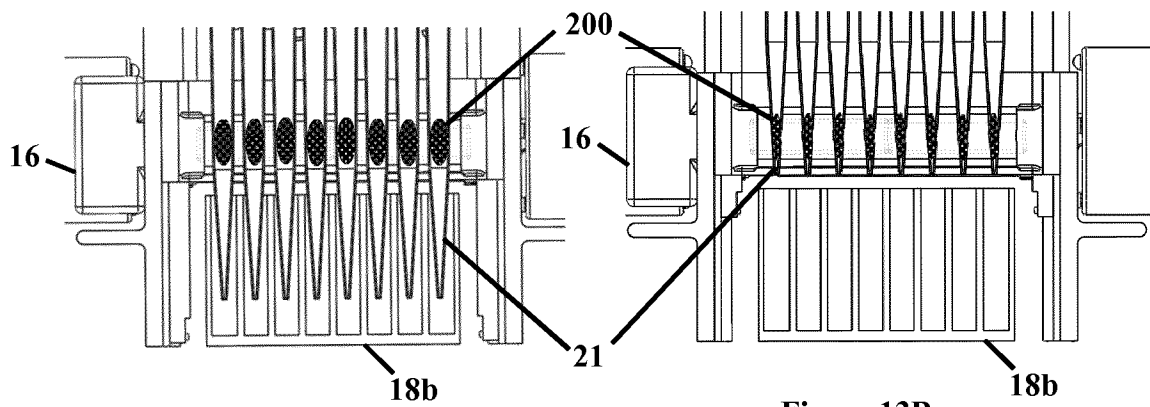


Figure 13A

Figure 13B

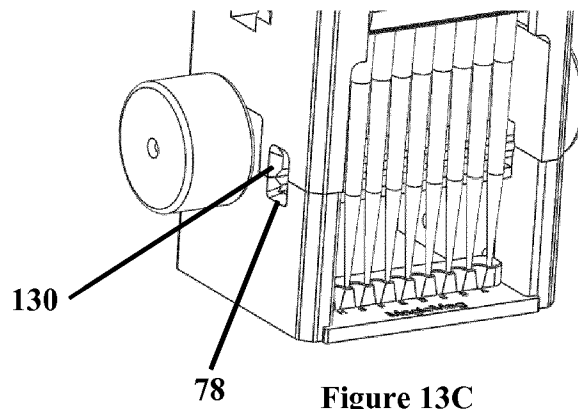


Figure 13C

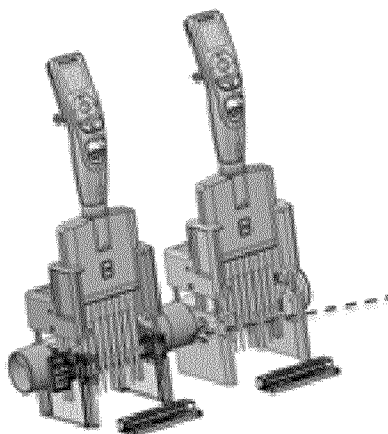


Figure 14

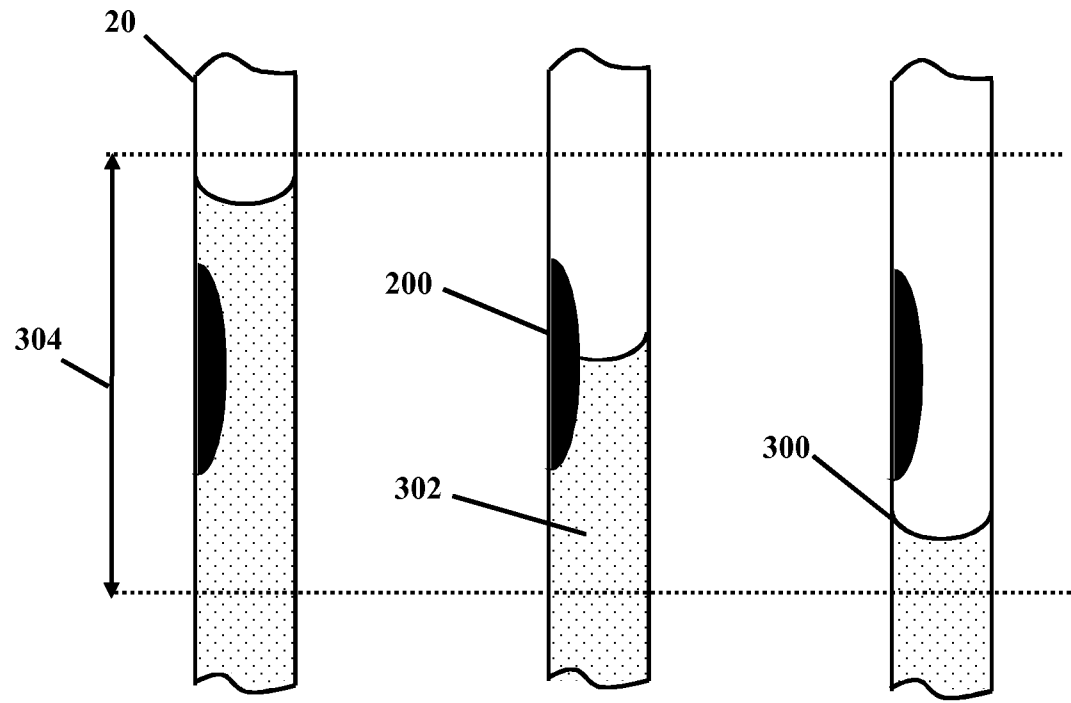


Figure 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C12M1/34 C12Q1/68
ADD.

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)
C12N C12M 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, 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	US 5 234 809 A (BOOM WILLEM R [NL] ET AL) 10 August 1993 (1993-08-10) cited in the application the whole document	1-31
Y	US 2011/076205 A1 (KELLY TERRENCE [US] ET AL) 31 March 2011 (2011-03-31) cited in the application the whole document	1-31
Y	WO 03/006168 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; COLIN BRUNO [FR]) 23 January 2003 (2003-01-23) voir en particulier les pages 2-6 et figures 1-3; the whole document	1-31
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

17 January 2017

Date of mailing of the international search report

26/01/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vix, Olivier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078905

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/083165 A1 (PRIMADIAG S A S [FR]) 5 June 2014 (2014-06-05) voir pages 3-5 et figure 1, 3-4; the whole document -----	1-31
Y	EP 1 081 234 A2 (TOYO BOSEKI [JP]) 7 March 2001 (2001-03-07) voir revendications 1-7 et pages 2-3; the whole document -----	1-31
Y	WO 2007/051859 A1 (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; AJ CYBERTRON GES FUER LABORAUT [DE]; TIMO HIL) 10 May 2007 (2007-05-10) voir en particulier pages 2-6 et revendications 1-3, 4, 13; the whole document -----	1-31
A	WO 2014/072438 A1 (BIOMÉRIEUX [FR]) 15 May 2014 (2014-05-15) the whole document -----	1-31
A	EP 1 589 105 A1 (BECTON DICKINSON CO [US]) 26 October 2005 (2005-10-26) the whole document -----	1-31
A	EP 1 992 689 A1 (TOSOH CORP [JP]) 19 November 2008 (2008-11-19) the whole document -----	1-31
A	EP 1 455 191 A1 (TOYO BOSEKI [JP]) 8 September 2004 (2004-09-08) the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/078905

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5234809	A	10-08-1993	NONE
US 2011076205	A1	31-03-2011	NONE
WO 03006168	A1	23-01-2003	AT 310585 T 15-12-2005 DE 60207564 D1 29-12-2005 DE 60207564 T2 27-07-2006 EP 1404450 A1 07-04-2004 FR 2826882 A1 10-01-2003 JP 4209769 B2 14-01-2009 JP 2004534243 A 11-11-2004 US 2004235196 A1 25-11-2004 US 2008257825 A1 23-10-2008 WO 03006168 A1 23-01-2003
WO 2014083165	A1	05-06-2014	EP 2926144 A1 07-10-2015 FR 2999012 A1 06-06-2014 WO 2014083165 A1 05-06-2014
EP 1081234	A2	07-03-2001	EP 1081234 A2 07-03-2001 JP 4045475 B2 13-02-2008 JP 2001070827 A 21-03-2001 US 6607662 B1 19-08-2003 US 2003006193 A1 09-01-2003
WO 2007051859	A1	10-05-2007	AT 495270 T 15-01-2011 DE 102005053463 A1 10-05-2007 DK 1951904 T3 09-05-2011 EP 1951904 A1 06-08-2008 ES 2360761 T3 08-06-2011 US 2009069555 A1 12-03-2009 WO 2007051859 A1 10-05-2007
WO 2014072438	A1	15-05-2014	EP 2916939 A1 16-09-2015 FR 2997703 A1 09-05-2014 US 2015292994 A1 15-10-2015 WO 2014072438 A1 15-05-2014
EP 1589105	A1	26-10-2005	CA 2503206 A1 23-10-2005 EP 1589105 A1 26-10-2005 ES 2333532 T3 23-02-2010 US 2005239091 A1 27-10-2005
EP 1992689	A1	19-11-2008	CN 101384715 A 11-03-2009 EP 1992689 A1 19-11-2008 JP 5212099 B2 19-06-2013 KR 20080094692 A 23-10-2008 TW 200811291 A 01-03-2008 US 2010035331 A1 11-02-2010 WO 2007094506 A1 23-08-2007
EP 1455191	A1	08-09-2004	EP 1455191 A1 08-09-2004 JP 2003149255 A 21-05-2003 US 2005118066 A1 02-06-2005 WO 03042705 A1 22-05-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/078905

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N15/10 C12M1/34 C12Q1/68 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) C12N C12M 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, 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	US 5 234 809 A (BOOM WILLEM R [NL] ET AL) 10 août 1993 (1993-08-10) cité dans la demande le document en entier -----	1-31
Y	US 2011/076205 A1 (KELLY TERRENCE [US] ET AL) 31 mars 2011 (2011-03-31) cité dans la demande le document en entier -----	1-31
Y	WO 03/006168 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; COLIN BRUNO [FR]) 23 janvier 2003 (2003-01-23) voir en particulier les pages 2-6 et figures 1-3; le document en entier ----- -/-	1-31
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">17 janvier 2017</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">26/01/2017</div>
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 <div style="text-align: center;">Vix, Olivier</div>

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	WO 2014/083165 A1 (PRIMADIAG S A S [FR]) 5 juin 2014 (2014-06-05) voir pages 3-5 et figure 1, 3-4; le document en entier -----	1-31
Y	EP 1 081 234 A2 (TOYO BOSEKI [JP]) 7 mars 2001 (2001-03-07) voir revendications 1-7 et pages 2-3; le document en entier -----	1-31
Y	WO 2007/051859 A1 (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; AJ CYBERTRON GES FUER LABORAUT [DE]; TIMO HIL) 10 mai 2007 (2007-05-10) voir en particulier pages 2-6 et revendications 1-3, 4, 13; le document en entier -----	1-31
A	WO 2014/072438 A1 (BIOMÉRIEUX [FR]) 15 mai 2014 (2014-05-15) le document en entier -----	1-31
A	EP 1 589 105 A1 (BECTON DICKINSON CO [US]) 26 octobre 2005 (2005-10-26) le document en entier -----	1-31
A	EP 1 992 689 A1 (TOSOH CORP [JP]) 19 novembre 2008 (2008-11-19) le document en entier -----	1-31
A	EP 1 455 191 A1 (TOYO BOSEKI [JP]) 8 septembre 2004 (2004-09-08) le document en entier -----	1-31

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2016/078905

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5234809	A	10-08-1993	AUCUN	
US 2011076205	A1	31-03-2011	AUCUN	
WO 03006168	A1	23-01-2003	AT 310585 T DE 60207564 D1 DE 60207564 T2 EP 1404450 A1 FR 2826882 A1 JP 4209769 B2 JP 2004534243 A US 2004235196 A1 US 2008257825 A1 WO 03006168 A1	15-12-2005 29-12-2005 27-07-2006 07-04-2004 10-01-2003 14-01-2009 11-11-2004 25-11-2004 23-10-2008 23-01-2003
WO 2014083165	A1	05-06-2014	EP 2926144 A1 FR 2999012 A1 WO 2014083165 A1	07-10-2015 06-06-2014 05-06-2014
EP 1081234	A2	07-03-2001	EP 1081234 A2 JP 4045475 B2 JP 2001070827 A US 6607662 B1 US 2003006193 A1	07-03-2001 13-02-2008 21-03-2001 19-08-2003 09-01-2003
WO 2007051859	A1	10-05-2007	AT 495270 T DE 102005053463 A1 DK 1951904 T3 EP 1951904 A1 ES 2360761 T3 US 2009069555 A1 WO 2007051859 A1	15-01-2011 10-05-2007 09-05-2011 06-08-2008 08-06-2011 12-03-2009 10-05-2007
WO 2014072438	A1	15-05-2014	EP 2916939 A1 FR 2997703 A1 US 2015292994 A1 WO 2014072438 A1	16-09-2015 09-05-2014 15-10-2015 15-05-2014
EP 1589105	A1	26-10-2005	CA 2503206 A1 EP 1589105 A1 ES 2333532 T3 US 2005239091 A1	23-10-2005 26-10-2005 23-02-2010 27-10-2005
EP 1992689	A1	19-11-2008	CN 101384715 A EP 1992689 A1 JP 5212099 B2 KR 20080094692 A TW 200811291 A US 2010035331 A1 WO 2007094506 A1	11-03-2009 19-11-2008 19-06-2013 23-10-2008 01-03-2008 11-02-2010 23-08-2007
EP 1455191	A1	08-09-2004	EP 1455191 A1 JP 2003149255 A US 2005118066 A1 WO 03042705 A1	08-09-2004 21-05-2003 02-06-2005 22-05-2003