

EXAMEN EUROPÉEN DE QUALIFICATION 2019

Épreuve A

Cette épreuve contient :

- | | |
|-------------------------|-----------------|
| * Lettre du demandeur | 2019/A/FR/1-7 |
| * Dessins de la demande | 2019/A/FR/8 |
| * Document D1 | 2019/A/FR/9-10 |
| * Document D2 | 2019/A/FR/11-12 |



Lettre du demandeur

CELLabrate Ltd, Kidlington, Oxfordshire, Royaume-Uni

5 Chère Madame Organa,

[001] Notre société conçoit et fabrique des dispositifs qui sont utilisés pour cultiver des cellules en laboratoire. Nous sommes actuellement en déplacement pour rencontrer au Japon un client potentiel qui est intéressé par notre technologie. Avant de le rencontrer, nous souhaitons protéger nos idées par une demande de brevet. Malheureusement, nous serons tous dans l'avion pour le Japon pendant les 12 prochaines heures et ne serons donc pas disponibles pour répondre à des questions. Vous trouverez donc ci-joint toutes les informations dont vous aurez besoin pour rédiger et déposer la demande aujourd'hui. Je joins également deux documents (D1 et D2) qui pourront vous être utiles pour comprendre le contexte de notre invention. Veuillez noter que, conformément à la politique de notre entreprise, nous ne paierons pas de taxe de revendication supplémentaire.

[002] Afin de réussir à cultiver des cellules dans un milieu de culture, c'est-à-dire en laboratoire, il faut fournir aux cellules ce qui est essentiel à leur croissance et à leur respiration. Les cellules dérivées d'animaux ou d'êtres humains sont normalement cultivées dans un milieu liquide qui contient tous les nutriments nécessaires. Les cellules sont habituellement cultivées dans des conditions contrôlées, notamment en ce qui concerne le pH, la température et les échanges de gaz comme l'oxygène (O₂) et le dioxyde de carbone (CO₂) avec l'environnement. Les dispositifs de culture cellulaire sont typiquement maintenus dans un incubateur dans lequel de l'oxygène est fourni à une concentration d'environ 20 %, afin que les cellules puissent recevoir suffisamment d'oxygène pour une croissance adéquate.



- [003]** Dans les dispositifs de culture cellulaire conventionnels tels que les plaques multipuits (cf. D1), l'alimentation en oxygène provient de l'espace du boîtier, situé au-dessus de la surface du milieu de culture cellulaire et appelé espace de tête. Par conséquent, la surface disponible pour les échanges gazeux est limitée et peut entraîner
- 5 de faibles taux de croissance des cellules. De plus, il peut y avoir une forte baisse initiale du pH au cours de la première heure ou des deux premières heures, du fait que le dioxyde de carbone provenant de l'espace de tête se dissout dans le milieu. Cette baisse de pH peut avoir une incidence négative sur le taux de croissance des cellules.
- [004]** L'invention surmonte ces problèmes en fournissant un dispositif de culture cellulaire comprenant une première membrane et une seconde membrane perméables aux gaz. Les membranes perméables aux gaz sont maintenues par un cadre afin de former une chambre de culture cellulaire entre les deux membranes opposés et le cadre. Le terme "perméable aux gaz" signifie que la membrane contient des pores
- 15 permettant aux gaz de la traverser. L'utilisation d'une membrane perméable aux gaz permet l'accroissement des échanges gazeux, en particulier de CO₂ et d'O₂. L'objectif de l'invention est d'augmenter les échanges gazeux et d'augmenter ainsi le taux de croissance des cellules.
- [005]** Afin d'éviter que le milieu de culture cellulaire ne sorte du dispositif, il est essentiel que les membranes perméables aux gaz soient imperméables aux liquides. Pour la même raison, les membranes doivent être attachées au cadre du dispositif au moyen d'une fermeture étanche. Nous avons trouvé avantageux d'utiliser une membrane perméable aux gaz et imperméable aux liquides qui est transparente optiquement, afin
- 25 de permettre l'observation des cellules. Il existe de nombreux types différents de membranes disponibles dans le commerce qui peuvent être utilisées, par exemple des membranes comprenant des polymères tels que polyéthylène, polycarbonate, polypropylène ou copolymère silicone. Le choix du polymère dépend du type de cellule à cultiver, du taux de transfert gazeux, et de la transparence optique.



[006] Nous avons découvert que les membranes perméables aux gaz comprenant du polyéthylène présentent une très bonne combinaison de caractéristiques pour la culture cellulaire. Nous avons en outre découvert que, sous pression atmosphérique normale (=10⁵ Pa) et à 37°C, les membranes ayant une performance de perméabilité aux gaz comprise entre 1 x 10⁻¹⁶ et 3 x 10⁻¹⁶ m³/(s·Pa) pour l'O₂ et entre 6 x 10⁻¹⁶ et 7 x 10⁻¹⁶ m³/(s·Pa) pour le CO₂ entraînent d'excellents taux de croissance des cellules. Les membranes classées dans ces intervalles de perméabilité aux gaz sont bien connues et disponibles sur le marché.

10 [007] Les cellules d'un certain type, appelées cellules adhérentes, doivent s'attacher à une surface pour croître. C'est pourquoi certains clients nous demandent de revêtir la surface intérieure d'une membrane ou des deux membranes perméables aux gaz d'une substance qui facilite l'adhésion des cellules. Différents types d'agents de revêtement sont disponibles à cette fin sur le marché, par exemple des molécules telles que la
15 gélatine, le collagène et la fibronectine.

[008] Nous avons testé plusieurs manières d'utiliser des membranes perméables aux gaz dans des dispositifs de culture cellulaire. Notre méthode la plus prometteuse d'un point de vue commercial consiste en un dispositif tel que représenté dans les
20 figures 1a - 1c.

La **figure 1a** montre une vue de dessus du dispositif de culture cellulaire.

La **figure 1b** montre une vue latérale du dispositif de culture cellulaire.

La **figure 1c** montre une coupe à travers le dispositif de culture cellulaire selon le plan A-A dessiné dans la figure 1a.

25 Le dispositif possède une première membrane 2a perméable aux gaz et une seconde membrane 2b perméable aux gaz qui sont maintenues par un cadre 1 afin de former une chambre de culture cellulaire 4 entre les deux membranes opposés 2a, 2b et le cadre 1. L'utilisation de deux membranes perméables aux gaz 2a, 2b sur des faces opposées du cadre augmente la surface disponible pour les échanges gazeux entre la
30 culture et l'incubateur. Le dispositif possède également au moins un orifice refermable de façon étanche 3a, 3b traversant le cadre 1 qui permet d'introduire des substances dans la chambre de culture ou d'en retirer de celle-ci.



[009] Nous avons pu fabriquer ce dispositif dans diverses formes et tailles afin de répondre aux besoins de nos clients. Cependant, nous avons découvert qu'une distance moyenne d'environ 1 mm à 5 mm entre les membranes fournit la quantité d'espace optimale pour que les cellules croissent tout en ayant une exposition suffisante aux gaz.

5

[010] Le cadre peut être fait dans n'importe quel matériau qui présente l'intégrité structurelle nécessaire pour que le dispositif reste relativement rigide, et qui soit adapté au contact avec les cellules. Par exemple, le cadre peut être fait dans une composition biocompatible comprenant un plastique ou thermoplastique adapté. Les dimensions du cadre dépendront au moins en partie du type de matériau utilisé. Nous fabriquons habituellement un dispositif de forme rectangulaire afin qu'il puisse être facilement maintenu par un porte-échantillons standard pour microscope. Pour cette même raison, la plupart de nos dispositifs mesurent environ 10 cm à 15 cm de long, environ 7 cm à 9 cm de large, et environ 0,2 cm à 2 cm de haut, les membranes ayant chacune une épaisseur de 0,05 mm à 0,15 mm.

10

15

[011] L'utilisation des deux membranes 2a, 2b et d'un cadre 1 pour former la chambre de culture cellulaire 4 présente l'inconvénient que le milieu liquide et les cellules ne peuvent pas être introduits ou retirés en ouvrant simplement le couvercle comme décrit dans D1. Il est donc essentiel qu'une ouverture refermable de façon étanche soit présente dans le dispositif de culture cellulaire. Deux variantes sont possibles pour concevoir une ouverture refermable de façon étanche : soit le cadre comprend au moins un orifice refermable de façon étanche 3a, 3b comme décrit plus haut, soit au moins l'une des membranes 2a, 2b est une membrane refermable de façon étanche comme décrit dans D2. Ainsi, afin de réaliser l'invention, le cadre du dispositif de culture cellulaire comprend au moins un orifice refermable de façon étanche 3a, 3b ou/et l'une des membranes 2a, 2b est attachée au cadre 1 de manière refermable de façon étanche.

20

25



[012] Premier mode de réalisation : Les orifices refermables de façon étanche 3a, 3b permettent à l'utilisateur d'introduire le milieu liquide et les cellules dans le dispositif, puis de les retirer une fois le processus de culture cellulaire terminé. Afin de garantir que le dispositif ne fuit pas, l'orifice 3a, 3b doit être refermable de façon étanche afin d'être
5 complètement fermé après ouverture. Nous préférons utiliser un joint, qui est une sorte de fermeture étanche mécanique. Lorsqu'une pointe d'aiguille est insérée dans le joint, celui-ci se referme autour de la pointe et en épouse le contour pour former une fermeture étanche, et il se referme sur lui-même lorsque l'on retire la pointe. Idéalement, le joint est fait dans un matériau élastomère capable de se déformer facilement, puis de
10 retrouver sa forme. Le matériau élastomère peut être un matériau naturel comme le caoutchouc naturel, ou un matériau synthétique comme le caoutchouc de silicone ou le caoutchouc fluorocarboné.

[013] L'orifice 3a, 3b est également une voie potentielle d'infection de la culture
15 cellulaire par des microbes du milieu environnant. Nous avons donc trouvé avantageux d'utiliser un joint comprenant un matériau élastomère associé à un agent antimicrobien intégré à celui-ci. De nombreux agents antimicrobiens différents disponibles sur le marché pourraient être utilisés, par exemple le triclosan ou le chloroxylénol.

[014] Il est utile que le cadre comprenne deux orifices 3a, 3b ou plus, l'utilisateur
20 pouvant ainsi introduire des substances (par exemple du milieu de culture frais) dans la chambre de culture par un orifice 3a, tandis que d'autres substances (telles que l'air ou le milieu usagé) sont retirées par l'autre orifice 3b. La plupart de nos clients utilisent une aiguille et une seringue de taille standard pour accéder à la chambre de culture
25 cellulaire. Par conséquent, il est avantageux que chaque orifice ait un diamètre généralement d'environ 1 mm à 2 mm suffisant pour permettre le passage d'une aiguille standard. Il est également préférable que le cadre ait une épaisseur suffisante et que l'orifice ou les orifices aient un diamètre suffisamment restreint pour empêcher la pointe de l'aiguille de toucher et de perforer l'une ou l'autre des membranes.



[015] Lorsqu'un orifice 3a, 3b dans le cadre 1 est utilisé comme ouverture refermable de façon étanche, il est essentiel que les deux membranes 2a, 2b soient fixées au cadre 1 d'une manière qui empêche le milieu liquide de s'échapper. Les membranes peuvent être fixées au cadre à l'aide d'un adhésif tel qu'un adhésif thermofusible. Cependant, nous préférons que chacune des membranes soit fixée au cadre par soudage ultrasonique, c'est-à-dire en faisant fondre la membrane sur le cadre de manière à former une fermeture étanche entre la membrane et le cadre. Nous pensons que ces procédés de fabrication d'un dispositif de culture cellulaire pourraient avoir un intérêt commercial.

5

[016] Deuxième mode de réalisation : au lieu d'un orifice dans le cadre, il est alternativement possible de rendre une membrane 2b refermable de façon étanche, afin que le dispositif puisse être ouvert et refermé de façon étanche de multiples fois. De cette manière, il est plus facile de prélever des échantillons de la culture cellulaire ou d'ajouter du milieu de culture cellulaire liquide.

10

[017] Si l'ouverture refermable de façon étanche est réalisée au moyen d'une membrane refermable de façon étanche 2b, nous devons, pour attacher au cadre la membrane refermable de façon étanche, utiliser des adhésifs différents de ceux du premier mode de réalisation. Pour le deuxième mode de réalisation, il est essentiel que l'adhésif soit sensible à la pression, de sorte que lorsque la membrane refermable de façon étanche est à nouveau pressée contre le cadre, elle forme une fermeture étanche. L'adhésif sensible à la pression ne laisse pas de résidu collant lorsque la membrane refermable de façon étanche est retirée du cadre, et permet donc de multiples ouvertures et fermetures de la membrane. Plusieurs adhésifs sensibles à la pression différents sont disponibles dans le commerce et tous ceux que nous avons testés ont fonctionné de manière adéquate.

20

25



5 **[018]** Troisième mode de réalisation : les premier et deuxième modes de réalisation peuvent également être combinés de telle manière que le cadre comprend au moins un orifice refermable de façon étanche 3a, 3b et qu'une membrane 2b est attachée au cadre 1 de manière refermable de façon étanche, à l'aide d'un adhésif sensible à la pression.

10 **[019]** L'utilisation des deux membranes opposés 2a, 2b et d'un cadre 1 pour former la chambre de culture cellulaire 4 ne permet que les trois modes de réalisations décrits ci-dessus. Pour le deuxième et le troisième mode de réalisation, il est essentiel que l'adhésif soit sensible à la pression. Pour les trois modes de réalisation, il est avantageux que les première et seconde membranes soient en contact direct avec l'air afin de permettre les échanges gazeux. Cela peut être réalisé au moyen d'un bâti qui peut maintenir le dispositif dans l'incubateur de manière à laisser suffisamment d'espace entre chacune des membranes et l'incubateur pour permettre à l'air de circuler.

15 **[020]** Comme nous l'avons expliqué plus haut, le dispositif peut être utilisé dans un procédé de culture cellulaire. Un procédé typique de culture cellulaire dans notre dispositif comprend les étapes suivantes :

- 20 a) suspendre des cellules à cultiver dans une quantité appropriée de milieu de culture cellulaire afin de former une suspension cellulaire ;
b) introduire la suspension cellulaire dans le dispositif de culture cellulaire ;
c) incuber le dispositif de culture cellulaire contenant la suspension cellulaire, dans des conditions permettant la croissance des cellules.

25 **[021]** Lorsqu'un taux de croissance des cellules particulièrement élevé est requis, la chambre de culture cellulaire peut être remplie entièrement de suspension cellulaire, de telle sorte qu'il n'y a plus d'espace de tête contenant de l'air. De cette manière, il est possible d'empêcher une baisse du pH causée par la dissolution du CO₂ contenu dans l'espace de tête. De plus, lorsque la chambre de culture est entièrement remplie de
30 suspension, le dispositif peut être incliné ou agité doucement sans que se forme une mousse qui pourrait perturber la croissance des cellules les cellules.

Cordialement,

M. B. Kenobi



Dessins de la demande

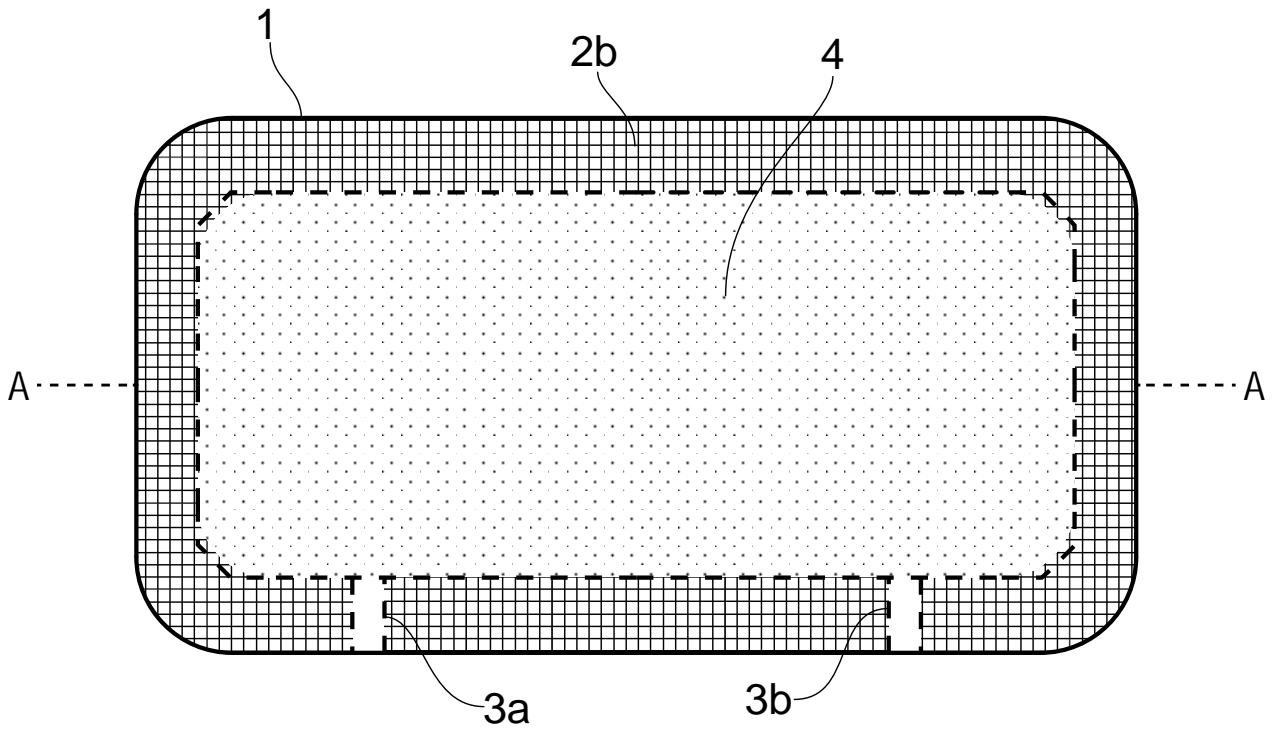


Figure 1a

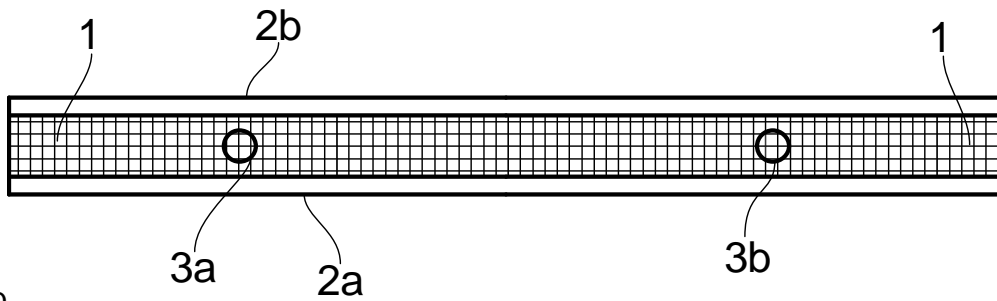


Figure 1b

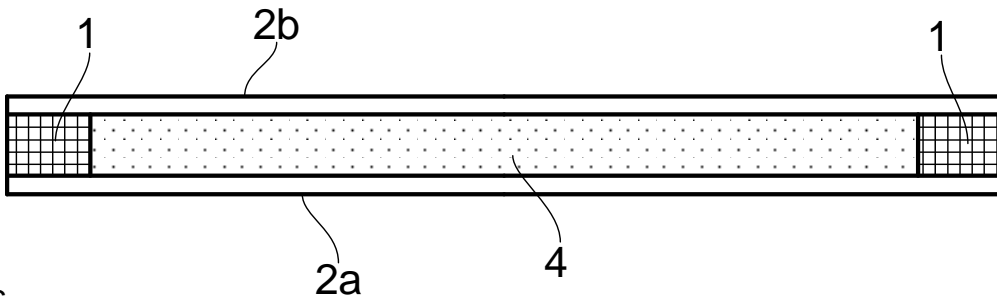


Figure 1c



Document D1

Extrait de manuel

5 [001] La culture cellulaire est définie comme l'action de prélever des cellules dans leur environnement naturel et de les faire ensuite croître dans un environnement artificiel. Les environnements artificiels adaptés se composent typiquement d'un boîtier contenant un milieu de culture cellulaire qui fournit les nutriments essentiels à la croissance. Les cellules ont également besoin de différents gaz, en particulier de dioxyde de carbone (CO₂) et d'oxygène (O₂). Les cellules croissent et sont maintenues dans un incubateur
10 de cellules à une température appropriée et dans un mélange gazeux approprié.

[002] Un boîtier conventionnel se présentant sous la forme d'une plaque multipuits est représenté par la figure 1. La plaque 11 est composée d'une surface plane comprenant une série de puits 12 qui contiennent le milieu de culture cellulaire et les cellules.
15 Pendant l'utilisation, les puits sont recouverts d'un couvercle étanche à l'air 13 qui se fixe solidement et ferme les puits de façon étanche. Les plaques comme les couvercles sont typiquement faits dans un plastique rigide étanche à l'air tel que le polystyrène. Les plaques et les couvercles sont également transparents optiquement, afin de permettre l'observation des cellules pendant leur culture. Une ou plusieurs surfaces des puits
20 peuvent être traitées afin de permettre l'attachement de cellules adhérentes, par exemple en revêtant la surface d'une substance comme le collagène.

[003] Il se peut que des puits individuels 12 doivent à nouveau être remplis de milieu liquide sans perturber la croissance des cellules dans les autres puits. À cette fin, un orifice refermable de façon étanche peut être prévu dans le couvercle ou dans la plaque,
25 ce qui permet d'accéder individuellement à chacun des puits. À la place d'un couvercle rigide, une membrane perméable aux gaz peut être utilisée. Une telle membrane est disponible sur le marché sous le nom de produit GasEasy™.



[004] Les conditions optimales de culture cellulaire sont différentes pour chaque type de cellule. Cependant, tous les procédés de culture cellulaire comprennent les mêmes étapes de base, à savoir :

- 5
- a) suspendre des cellules à cultiver dans une quantité appropriée de milieu de culture cellulaire afin de former une suspension cellulaire ;
 - b) introduire la suspension cellulaire dans le récipient de culture cellulaire ;
 - c) incuber le récipient de culture cellulaire contenant la suspension cellulaire, dans des conditions permettant la croissance des cellules.

10 Les conditions de croissance des cellules, telles que la température et la pression appropriées, sont bien connues de l'état de la technique.

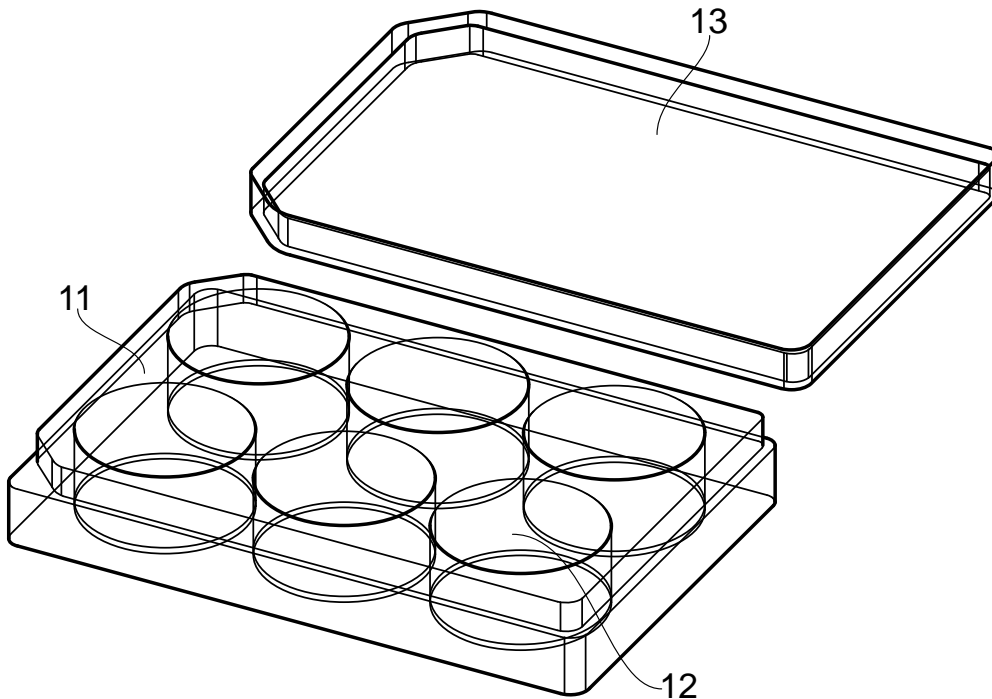


Figure 1



Document D2

Brochure produit

5 [001] Le film de fermeture étanche GasEasy™ offre un moyen simple et efficace de permettre aux gaz de pénétrer dans les cultures cellulaires, tout en formant une barrière à la contamination. GasEasy™ est une membrane adhésive perméable aux gaz et imperméable aux liquides qui peut être utilisée pour fermer de façon étanche les orifices d'un boîtier de culture cellulaire. Le film ne laisse pas de résidu collant lorsqu'il est retiré, ce qui permet à l'orifice d'être ouvert puis refermé de façon étanche à de multiples
10 reprises.

[002] Les films GasEasy™ permettent des échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone rapides et uniformes pour une croissance optimale des cellules. Ils sont très perméables aux gaz, avec une performance de perméabilité aux gaz, sous pression
15 atmosphérique (10^5 Pa) et à 37°C, d'environ $1,5 \times 10^{-16} \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$ pour l'O₂ et d'environ $6 \times 10^{-16} \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$ pour le CO₂.

[003] GasEasy™ est fait d'une membrane comprenant du polyéthylène qui est conçue pour rester stable dans un intervalle de conditions de températures. Le film se retire et
20 se replace également facilement, ce qui permet de prélever facilement des échantillons de la culture cellulaire ou d'ajouter du milieu de culture cellulaire. Le film est souple et entièrement transparent. La membrane GasEasy™ étant imperméable aux liquides, elle empêche également de renverser le milieu de culture.

25 [004] GasEasy™ est idéalement adapté à la fermeture étanche de plaques multipuits, comme le montre la figure 1. Il suffit d'appliquer le ou les films adhésifs sur la surface de la plaque, puis d'appuyer dessus pour fermer de façon étanche le bord de chaque puits. Pour assurer une fermeture étanche, appliquez avec une pression ferme et uniforme. Un rouleau en gomme dure peut être utilisé à cette fin. Dans le cas de plaques
30 multipuits de grandes dimensions, il est possible d'utiliser plusieurs films juxtaposés les uns à côtés des autres.



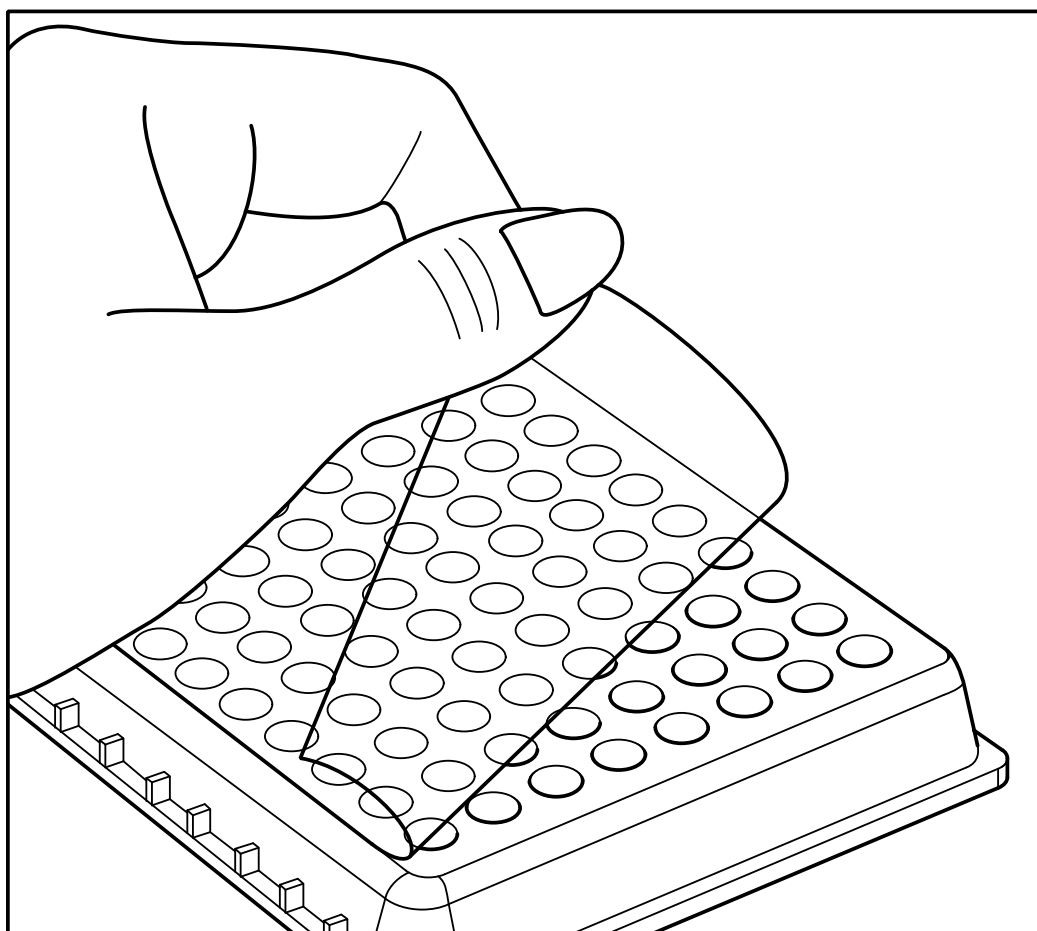


Figure 1

