



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 37783 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/682; C12Q 1/6844; C12Q 1/6851**
- (43) Date de publication : **30.09.2016**

- 
- (21) N° Dépôt : **37783**
- (22) Date de Dépôt : **19.01.2015**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE RABAT 10100 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Bouzekri Hicham ; Sefrioui El Hassane ; Ait Benhassou Hassan ; Lakssir Brahim ; Ressami El Mostafa**
- (74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

- 
- (54) Titre : **Système électronique basé sur la méthode LAMP pour le diagnostic des Maladies Infectieuses**
- (57) Abrégé : La présente innovation consiste en un système d'une taille de carte bancaire pour la détection des maladies infectieuses. Ce système baptisé « Lab-On-Card » ou LOC, utilise la méthode d'amplification iso-thermique induit par boucle (LAMP) pour détecter et identifier des séquences d'ADN cibles après interaction avec des réactifs spécifiques inclus dans la Lac. L'ensemble du processus est déclenché par l'utilisateur final après dépôt de l'échantillon du patient dans la zone désignée et libération mécanique de l'ADN spécifique à l'agent infectieux. Cette séquence d'ADN interagi directement avec le milieu réactionnel au niveau de la LOC initialisant ainsi la réaction LAMP. Les conditions de réaction sont contrôlées et suivies par un circuit électronique embarqué qui allume une LED verte pour signaler que la réaction se déroule selon le protocole demandé et que les résultats sont prêt à être lus, ou allume une LED rouge pour signaler que l'expérience doit être redémarrée sur un autre Lac. Le substrat sur lequel le système est construit, étant transparent à l'utilisateur final, doit voir un changement de couleur dans la chambre de réaction signalant la présence de la maladie infectieuse, ou pas de changement qui signifie que l'échantillon ne contient pas d'agents infectieux de la maladie.

31 OCT 2016

**Système électronique basé sur la méthode LAMP pour le diagnostic des Maladies  
Infectieuses**

5

**Abrégé :**

La présente innovation consiste en un système d'une taille de carte bancaire pour la  
10 détection des maladies infectieuses. Ce système baptisé « Lab-On-Card » ou LOC, utilise la  
méthode d'amplification iso-thermique induit par boucle (LAMP) pour détecter et identifier  
des séquences d'ADN cibles après interaction avec des réactifs spécifiques inclus dans la  
LOC.

L'ensemble du processus est déclenché par l'utilisateur final après dépôt de l'échantillon du  
15 patient dans la zone désignée et libération mécanique de l'ADN spécifique à l'agent  
infectieux. Cette séquence d'ADN interagi directement avec le milieu réactionnel au niveau  
de la LOC initialisant ainsi la réaction LAMP.

Les conditions de réaction sont contrôlées et suivies par un circuit électronique embarqué  
qui allume une LED verte pour signaler que la réaction se déroule selon le protocole  
20 demandé et que les résultats sont prêt à être lus, ou allume une LED rouge pour signaler que  
l'expérience doit être redémarrée sur un autre LOC.

Le substrat sur lequel le système est construit, étant transparent à l'utilisateur final, doit voir  
un changement de couleur dans la chambre de réaction signalant la présence de la maladie  
infectieuse, ou pas de changement qui signifie que l'échantillon ne contient pas d'agents  
25 infectieux de la maladie.

**Système électronique basé sur la méthode LAMP pour le diagnostic de Maladies  
Infectieuses**

5

**Domaine de l'invention**

La présente invention concerne le domaine de diagnostic des maladies infectieuses. En particulier elle concerne un système électronique basé sur la méthode LAMP pour l'amplification et la détection des pathogènes de maladies infectieuses en utilisant un système électronique.

10

**Art antérieur**

La miniaturisation et l'intégration des systèmes analytiques complexes permettant de reproduire des protocoles biologiques et chimiques à l'échelle microscopique revêtent un caractère important et déterminant dans le diagnostic des maladies infectieuses. En effet, ces systèmes à bas coût de production et basse consommation d'énergie, en contraste avec les systèmes standards, délivrent à l'utilisateur des diagnostics médicaux de façon automatisée et rapide avec une meilleure sensibilité et à partir d'échantillons de très faibles volumes et minimal quantité de molécules cibles. Ce diagnostic permet d'identifier rapidement l'agent pathogène responsable d'une maladie infectieuse et d'orienter le traitement.

15

20

Le brevet US20140356874\_A1 présente une solution pour la détection et l'amplification de séquence d'acide nucléique basée sur la méthode LAMP. Il s'agit d'une solution exigeant des utilisateurs hautement qualifiés, une puissance électrique importante et utilisant des traitements et des lectures compliquées.

25

Face à ces difficultés d'utilisation, et dans le but d'améliorer les performances des solutions de diagnostic à travers la facilité d'utilisation, l'optimisation de la consommation d'énergie

et la réduction des coûts de fabrication, nous avons développé un système innovant de diagnostic et d'amplification de séquences ADN : le système Lab-On-Card.

### **Description détaillée de l'invention**

L'invention est décrite en faisant référence aux figures 1 et 2.

5 La figure 1 est un schéma de la configuration du système objet de l'invention avec les différentes comosantes.

La figure 2 est un résultat du test pour détection de la maladie de la tuberculose.

10 Le système Lab-On-Card objet de la présente invention utilise une carte électronique (10) combinée à un module thermoélectrique (20) et une architecture micro-fluidique (30). L'ensemble étant contrôlé par une interface graphique (40).

Le système réalise un cycle thermique d'amplification (LAMP) après introduction de l'échantillon du patient et les réactifs dans la puce micro-fluidique (30).

15 Selon un premier aspect de l'invention, le système électronique (10) est composé d'un circuit imprimé contenant l'ensemble des composants électroniques hardware et software intégrés pour réaliser les différents cycles thermiques d'amplification et de détection avec une lecture des résultats en temps réel.

20 Le système est caractérisé par le fait que la carte (10) permet, via de l'électronique embarquée, de réaliser des cycles thermiquement stables et indépendants des fluctuations externes grâce à un micro chauffage utilisant une Puce Thermoélectrique (20).

Selon un deuxième aspect de l'invention, le système dispose d'une interface (103) pour paramétrage pour différents cycles d'amplification (103). Cette particularité permet une grande adaptabilité du système pour traité détecter différentes maladies.

25 Le système, pour une contrainte pratique de mobilité et d'indépendance de la présence du courant électrique, est doté de moyens d'alimentation sous forme d'une pile (101).

Selon au autre aspect de l'invention, le système est divisé sur trois blocs :

- Bloc d'alimentation (101) : ce bloc a pour fonction de fournir les tensions pour la mise en marche de la carte ;

- Bloc de commande (102) : son rôle consiste à commander la puce thermoélectrique et la puce micro-fluidique ;
- Bloc de contrôle (103) : consiste à paramétrer les composants de la carte pour différents cycles d'amplification (LAMP)

5

Le fonctionnement du système est basé sur les éléments suivants :

**Une architecture Micro-Fluidique (30) :** Cette architecture est composée d'une puce micro-fluidique en verre, en PDMS ou d'autre polymère inerte où sera introduit les différents réactifs et échantillons du patient. Les échantillons peuvent être de différentes matrices y  
10 compris aliments, urine, salive, mucus, sang, tissu, cellules, ADN, ARN, protéine, matière animale, liquides, solutions, et autre matrice d'échantillons.

**Une puce Thermoélectrique (20) :** Après avoir introduit l'échantillon à diagnostiquer et les réactifs, l'amplification LAMP est effectuée selon un cycle thermique prédéfini via l'interface (103). La puce thermoélectrique (20) assure les différentes températures du cycle  
15 thermique. Ce module assure une régulation autonome de la température et ne nécessite pas une intégration de module de stabilisation ou régulation de la température.

**Une interface Graphique (40) :** Cette interface aura pour fonction le traitement des données pour faciliter l'utilisation et la lecture des résultats.

Le système intègre une source d'excitation utilisant une source de lumière UV. La lecture est  
20 basée sur le changement de la couleur du mélange réactionnel. Des moyens optiques permettent de lire la couleur et de communiquer le résultat à l'interface.

Selon un autre aspect de l'invention, l'échantillon test ne subira aucun déplacement lors du déroulement du test. L'ensemble des opérations (cycle thermique+ lecture) sont gérés par les blocs de commandes (102) et (103).

25 **Exemple:**

D'autres particularités et caractéristiques de l'invention ressortiront de la description détaillée d'un mode de réalisation avantageux présenté ci-dessous, à titre d'illustration.

***Détection de la Tuberculose***

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse due à l'infection par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Chaque année, près de 1% de la population mondiale est nouvellement infectée et environ 8 millions de personnes développent la maladie. Au Maroc comme, dans la plupart des pays en développement, la tuberculose constitue un problème majeur de santé publique avec plus de 30 000 nouveaux cas de tuberculose. Environ 70% des cas dépistés sont concentrés dans les zones les plus urbanisées et les plus peuplées (Rabat, Kenitra, Tanger, Fes et Casablanca).

Le diagnostic bactériologique classique de la tuberculose repose sur l'examen microscopie par la recherche des bactéries résistantes, la culture et l'identification par l'étude des caractères cultureux et biochimiques des bacilles tuberculeux. Cette culture s'avère lente fastidieuse en raison du temps de génération très long des bactéries, mais également à cause de la nature des prélèvements qui peuvent être réduits en nombre d'agent infectieux. Parmi les kits de diagnostic moléculaire qui ont été développés récemment, le kit GeneXpert MTB/RIF (Cepheid), qui permet l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) du gène cible, cependant ce test nécessite une machine très coûteuse pour effectuer l'extraction d'ADN.

Pour remédier aux obstacles de temps, difficulté technique et coût, et pour le diagnostic de la tuberculose, on a utilisé dans la présente invention une LOC à base de la méthode LAMP.

En accordance avec cette invention, la détection de la bactérie (*Mycobacterium tuberculosis*) responsable de la tuberculose est réalisée par la méthode LAMP effectuée sur un support transparent de quelque cm de taille et en utilisant un mélange réactionnel composé de:

- tampon d'amplification (Trizma® Tris-HCL, Le chlorure de Potassium KCl, le sulfate d'ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , le sulfate de magnésium  $\text{MgSO}_4$ , Triton, Betaine
- amorces (séquence nucléotidiques) du gène IS6110 (amorces internes (FIP,BIP), amorces externes (FOP,BOP) et amorces boucles (FLP,BLP))
- désoxynucléotides triphosphates (dNTPs)
- enzyme Bst Warmt start
- agent intercalant de l'ADN (SYBR® Green)

Après dépôt du mélange réactionnel sur la puce, l'ADN bactérienne est rajoutée et le cycle thermique intégré est lancé (une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min, une étape d'hybridation et élongation à 65°C pendant 1h30 et une étape d'inactivation enzymatique à 80°C pendant 5 min). Les réactions positives sont révélées par une couleur vert-fluorescente visible à l'œil nu et sous excitation par UV (Figure 2). Le système dispose de moyen pour une lecture automatique du résultat de la réaction en se basant sur le changement de la couleur du mélange après excitation avec une source de lumière UV intégré dans le système.

10

15

20

25

30

**Revendications :**

1. Méthode d'amplification et de détection d'une séquence d'acide nucléique cible des pathogènes de maladies infectieuses, basée sur la technologie LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) et **caractérisée en ce qu'elle** comprend les étapes suivantes :
  - a- l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon de patient
  - b- l'amplification de la séquence d'ADN cible, en utilisant le procédé amélioré de LAMP, par interaction de l'ADN extrait dans l'étape (a) avec un mélange réactionnel contenant une ADN polymérase de déplacement de brin et un ensemble d'amorces spécifiques de la séquence cible.
  - c- la détection de l'amplification de la séquence d'acide nucléique cible lorsqu'elle est présente dans le mélange réactionnel.
  
2. Méthode selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** la détection est basée sur le changement de couleur par fluorescence sous UV ou par colorimétrie.
  
3. Système électronique d'amplification et de détection d'une séquence d'acide nucléique cible des pathogènes de maladies infectieuses **caractérisé en ce qu'il** comprend:
  - Une carte électronique embarquée
  - un collecteur d'échantillon comportant au moins une chambre de réaction avec des réactifs d'amplification d'acide nucléique;
  - et une source de température ;
  
4. Système électronique d'amplification et de détection des pathogènes de maladies infectieuses, selon la revendication 3, **caractérisé en ce qu'il** est basé sur la méthode LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).
  
5. Système électronique d'amplification et de détection des pathogènes de maladies infectieuses, selon les revendications 3 et 4, **caractérisé en ce qu'il** utilise comme source de température, un module Peltier thermoélectrique pour assurer les cycles thermiques d'amplification.
  
6. Système électronique d'amplification et de détection des pathogènes de maladies infectieuses, selon les revendications 3 à 5, **caractérisé en ce que** la carte électronique embarquée contient un circuit de contrôle et de commande du Module Peltier pour assurer le cycle thermique de la LAMP.



Les Séquences d'amorces utilisées dans l'exemple présent sont les suivantes:

SEQ ID N°1: IS6110-FIP1

Longueur: 39

5 CGGGTAATTAGCGTGCTGGCCGCGAAGGGCGAACGCGAT

SEQ ID N°2: IS6110-BIP1

Longueur: 37

TCATCAGGGCCACCGCGAGGCTCGGTCAGCTGTGTGC

10

SEQ ID N°3: IS6110-FOP1

Longueur: 18

GGCGGGACAACGCCGAAT

15 SEQ ID N°4: IS6110-BOP1

Longueur: 19

GGTCGTAGTAGGTCGATGG

SEQ ID N°5: IS6110-FLP1

20 Longueur: 18

GGCCGCGAAGAAAGCCGA

SEQ ID N°6: IS6110-BLP1

Longueur: 18

25 TCGGTGGGGTGTGAGT

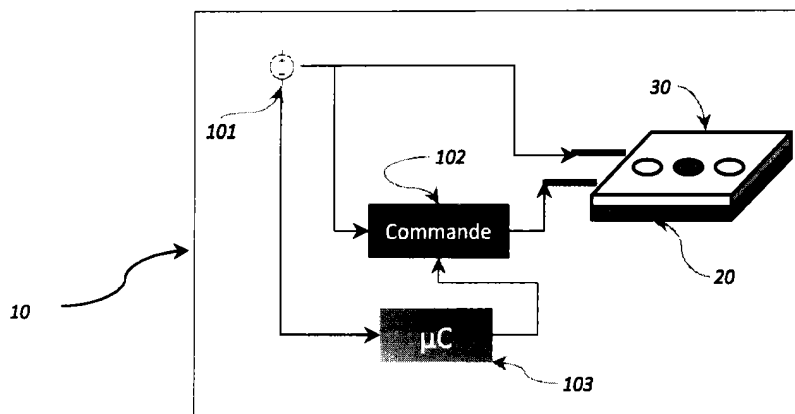


Fig. 1

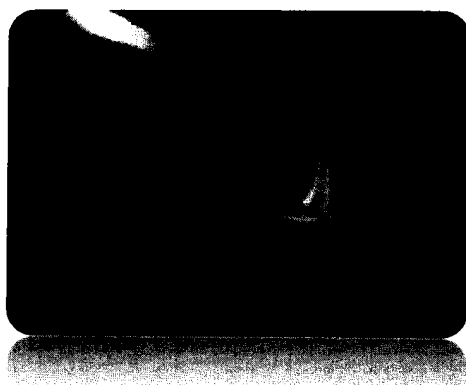


Fig. 2



**RAPPORT DE RECHERCHE  
 AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
 (Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative  
 à la protection de la propriété industrielle)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Renseignements relatifs à la demande</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                              |
| N° de la demande : 37783                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Date de dépôt : 19/01/2015                   |
| Déposant : MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)                                                                                                                                                                                                                                      |                                              |
| Intitulé de l'invention : Système électronique basé sur la méthode LAMP pour le diagnostic des Maladies Infectieuses.                                                                                                                                                                                                   |                                              |
| Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13. |                                              |
| 1. Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document                                                                                                                                                                                                              |                                              |
| Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :                                                                                                                                                                                                                                           |                                              |
| Partie 1 : Considérations générales                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport                                                                                                                                                                                                                                                   |                                              |
| <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                              |
| <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés                                                                                                                                                                                                                            |                                              |
| Partie 2 : Rapport de recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                              |
| Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                              |
| <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle                                                                                                                                                                              |                                              |
| <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Défaut d'unité d'invention                                                                                                                                                                                                                                                           |                                              |
| Examineur: M. Bendaoud                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Date d'établissement du rapport : 08/02/2015 |

**Partie 1 : Considérations générales***Cadre 1 : base du présent rapport*

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- a) Description  
6 Pages
- b) Revendications  
6
- c) Planches de dessin  
2 Pages

**Partie 2 : Rapport de recherche****Classement de l'objet de la demande :**

CPC : C12Q1/682 ; C12Q1/6844 ; C12Q1/6851

**Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :**

EPOQUE, Orbit

| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                 | N° des revendications visées |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| X          | WO2010054589 ; 2010/05/20; UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; CHENG SUK HANG [CN]; KWAN PATRICK [CN]; NG MARGARET HL [CN]<br>PAGE 8-12           | 1-2                          |
| A          | WO2011156841 ; 2011/12/22 ; GENEASYS PTY LTD [AU]; SILVERBROOK KIA [AU]; AZIMI MEHDI [AU]; FACER GEOFFREY RICHARD [AU]; MOINI ALIREZA [AU] | 1-6                          |

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

- « X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- « Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
- « E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

### Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

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

|                                              |                                             |            |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|
| Nouveauté (N)                                | Revendications 3-6<br>Revendications 1-2    | Oui<br>Non |
| Activité inventive (AI)                      | Revendications 3-6<br>Revendications 1-2    | Oui<br>Non |
| Possibilité d'application Industrielle (PAI) | Revendications 1-9<br>Revendications aucune | Oui<br>Non |

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : WO2010054589 ; 2010/05/20; UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; CHENG SUK HANG [CN]; KWAN PATRICK [CN]; NG MARGARET HL [CN]  
 D2 : WO2011156841 ; 2011/12/22 ; GENEASYS PTY LTD [AU]; SILVERBROOK KIA [AU]; AZIMI MEHDI [AU]; FACER GEOFFREY RICHARD [AU]; MOINI ALIREZA [AU]

#### 1. Nouveauté (N) :

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

L'objet de la 1<sup>ère</sup> revendication manque de nouveauté selon les dispositifs de l'article 26. L'invention en D1 concerne un procédé génétique de détection rapide de génotype HLA basé sur les principes d'amplification isotherme véhiculée par boucle (LAMP), et en particulier, un procédé et un kit pour la détection de l'allèle HLA-B\*1502 basée sur les principes LAMP. Le document D1 divulgue les caractéristiques techniques des revendications 1 et 2.

Par conséquent, l'objet de la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> revendication n'est pas nouveau.

Aucun des brevets mentionnés ci-dessus ne décrit le système électronique objet de la revendication 3 d'où l'objet de la revendication 3 est nouveau. Par la suite toutes les revendications dépendantes le sont.

#### 2. Activité inventive (AI) :

Le document D2 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 3 décrit un dispositif laboratoire sur puce destiné à la détection d'agents pathogènes, à l'analyse génétique et à l'analyse protéomique d'un échantillon biologique, en faisant appel à : une section de dialyse de leucocytes destinée à diviser l'échantillon en un flux de leucocytes et un flux d'agents pathogènes et d'érythrocytes; une section de dialyse d'agents pathogènes...