

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 42070 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 33/00**

(43) Date de publication :
31.12.2019

(21) N° Dépôt :
42070

(22) Date de Dépôt :
27.02.2018

(71) Demandeur(s) :
**CENTRE NATIONAL DE L'ENERGIE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES
NUCLÉAIRES (CNESTEN) , CNESTEN. BP 1382 RP. Rabat 10001 (MA)**

(72) Inventeur(s) :
MOUTAOUAKKIL ADNANE ; EL ABBADI NAJIA

(74) Mandataire :
Moutaouakkil Adnane

(54) Titre : **KIT ENZYMO-IMMUNOLOGIQUE POUR LE DOSAGE DE LA PROGESTERONE
DANS LE SERUM DES CAPRINS**

(57) Abrégé : Un kit enzymo-immunologique pour le dosage in vitro de la progestérone dans le sérum des caprins a été mis au point. Ce kit utilisé principalement pour la détermination de l'état physiologique des chèvres et le diagnostic précoce de la gestation est composé d'une combinaison innovante de nouveaux anticorps polyclonaux anti-progestérone produits localement et d'un traceur enzymatique de la progestérone marqué à la peroxydase. Ce kit de dosage s'est montré sensible et spécifique. L'étendue de la gamme étalon de a à 30 ng/ml est compatible avec les taux sériques physiologiques de progestérone observés au cours du cycle oestral des caprins. Les dosages réalisés avec ce kit ont montré des performances analytiques extrêmement satisfaisantes. La sensibilité du dosage a été évaluée à 2,45 ng/ml et la limite de détection à 0,05 ng/ml. Ce kit de dosage enzymo-immunologique permet d'analyser de façon simple, rapide, automatisée et peu onéreuse un grand nombre d'échantillons de sérum caprin.

13. ABREGE

Un kit enzymo-immunologique pour le dosage *in vitro* de la progestérone dans le sérum des caprins a été mis au point. Ce kit utilisé principalement pour la détermination de l'état physiologique des chèvres et le diagnostic précoce de la gestation est composé d'une combinaison innovante de nouveaux anticorps polyclonaux anti-progestérone produits localement et d'un traceur enzymatique de la progestérone marqué à la peroxydase. Ce kit de dosage s'est montré sensible et spécifique. L'étendue de la gamme étalon de 0 à 30 ng/ml est compatible avec les taux sériques physiologiques de progestérone observés au cours du cycle œstral des caprins. Les dosages réalisés avec ce kit ont montré des performances analytiques extrêmement satisfaisantes. La sensibilité du dosage a été évaluée à 2,45 ng/ml et la limite de détection à 0,05 ng/ml. Ce kit de dosage enzymo-immunologique permet d'analyser de façon simple, rapide, automatisée et peu onéreuse un grand nombre d'échantillons de sérum caprin.

Mots clés : Progestérone, Dosage enzymo-immunologique, EIA, Sérum, Caprins

KIT ENZYMO-IMMUNOLOGIQUE POUR LE DOSAGE DE LA PROGESTERONE DANS LE SERUM DES CAPRINS

1. DESCRIPTIF DE L'INVENTION

Un kit enzymo-immunologique (EIA) pour le dosage de la progestérone a été mis au point. Il a été validé pour le dosage de la progestérone dans le sérum des caprins. Ce kit de dosage s'est montré sensible et spécifique. L'étendue de la gamme étalon de 0 à 30 ng/ml est compatible avec les taux sériques physiologiques de progestérone observés au cours du cycle œstral des caprins. Les dosages réalisés avec ce kit ont montré des performances analytiques extrêmement satisfaisantes. La sensibilité du dosage a été évaluée à 2,45 ng/ml et la limite de détection à 0,05 ng/ml.

2. DOMAINES D'APPLICATION DE L'INVENTION

La présente invention concerne un dispositif de dosage *in vitro* de la progestérone utilisé principalement pour la détermination de l'état physiologique des chèvres et le diagnostic précoce de la gestation. Le présent kit est composé d'une combinaison innovante de nouveaux anticorps polyclonaux anti-progestérone produits localement et d'un traceur enzymatique de la progestérone marqué à la peroxydase. Ce kit de dosage enzymo-immunologique permet d'analyser de façon simple, rapide, automatisée et peu onéreuse un grand nombre d'échantillons de sérum caprin.

3. ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS

La progestérone est une hormone stéroïdienne synthétisée à partir du cholestérol. Elle est impliquée dans la fonction de la reproduction chez les femelles des mammifères. Elle joue un rôle essentiel dans le cycle œstral, la gestation et l'embryogenèse. Elle est synthétisée principalement dans l'ovaire et le placenta.

Chez la chèvre cyclée, la concentration sérique de la progestérone est minimale pendant l'œstrus. Elle augmente progressivement à partir du 3^{ème} jour du cycle, pour atteindre un maximum au 7^{ème} jour. Cette concentration reste stable jusqu'aux environs 16^{ème} jour pour ensuite diminuer rapidement suite à la lutéolyse. En cas de gestation, le taux de progestérone se maintient élevé suite à l'intervention du signal embryonnaire.

De ce fait, le dosage de la progestérone revêt un intérêt particulier dans le diagnostic et le suivi de la gestation. Cet intérêt est d'autant plus important dans le cas de l'élevage intensif des animaux, où le rendement de productivité constitue un enjeu économique capital. En effet, la progestéronémie est devenue au fil du temps un outil essentiel qui permet de suivre la conduite de reproduction dans les élevages. Elle est utilisée surtout pour réduire les périodes improductives, éliminer les femelles infertiles, constituer des lots d'animaux présentant des états physiologiques similaires, optimiser l'alimentation de ces animaux et prévenir d'éventuels échecs d'implantation dans le cas de l'insémination artificielle.

La progestéronémie peut s'opérer de différentes façons. Cependant, le dosage par immuno-analyse reste la technique de choix, tant sur le plan de l'efficacité que sur le plan du coût de revient. Les méthodes immuno-analytiques diffèrent ensuite selon la nature du signal émis par le traceur utilisé : radioactif, colorimétrique, fluorescent ou luminescent. Les enzymes restent toutefois les marqueurs les plus fréquemment utilisés en raison de leurs sensibilités élevées, de leurs coûts relativement faibles, de leurs prédispositions à l'automatisation et surtout de leurs maniabilités sans risque particulier.

Le principe de la méthode généralement utilisée, dite par compétition, consiste à mettre l'antigène à doser en compétition avec l'antigène marqué en quantité bien définie pour se lier à un anticorps utilisé en quantité restreinte. Les concentrations de l'anticorps et de l'antigène marqué étant limitantes, plus la concentration de l'antigène à doser est élevée plus la quantité de l'antigène marqué fixé est faible. La courbe d'étalonnage résultante est alors décroissante.

C'est dans cette optique où s'inscrit cette invention qui consiste à mettre au point un système de dosage EIA de la progestérone spécifique aux caprins en vue d'une application pour le diagnostic et le suivi de la gestation chez les chèvres d'élevage au Maroc. Nous en présentons ici un descriptif des différentes étapes suivies pour sa réalisation ainsi que les résultats d'évaluation de ses performances analytiques.

4. CONSTITUANTS DU KIT

Le différents constituants du kit EIA mis au point pour le dosage de la progestérone chez les caprins sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Constituants du kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum des caprins

Constituant	Quantité
Plaque ELISA de 96 puits revêtues d'anticorps anti-progestérone	1
Traceur enzymatique de la progestérone	1 × 7 ml
Solutions « étalons » (de S ₀ à S ₆)	7 × 0,5 ml
Solution de lavage	1 × 30 ml (10 × concentrée)
Solution de révélation	1 × 7 ml
Solution d'arrêt	1 × 7 ml

5. PREPARATION DES CONSTITUANTS DU KIT

5.1. Dérivés de la progestérone

Les dérivés de la progestérone à fonction carboxylique utilisés pour préparer l'immunogène et le traceur enzymatique sont respectivement, la progestérone 11 α -hemisuccinate (P11HS) et la progestérone 3-(O-carboxyméthyl) oxime (P3CMO). Ces dérivés ont été obtenus de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

5.2. Réactifs et tampons

Sauf indication, tous les réactifs chimiques utilisés proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Le tampon borate de sodium est constitué de 20,12 g/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 8). L'eau physiologique est constituée de 0,09% (p/v) NaCl. Le tampon phosphate est constitué de 1,44 g/l Na_2HPO_4 et 0,24 g/l KH_2PO_4 (pH 7,4). Le tampon PBS est constitué de 1,44 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l KH_2PO_4 ; 8 g/l NaCl et 0,2 g/l KCl (pH 7,4). Le tampon de « coating » est constitué de 0,96 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l NaH_2PO_4 et 0,5 g/l NaN_3 (pH 7,4). Le tampon de saturation est constitué de 6 g/l Tris-HCl; 3,2 g/l acide citrique; 10 g/l citrate de sodium; 1 g/l NaN_3 ; 10 g/l caséine et 50 g/l saccharose (Fluka) (pH 7,4).

5.3. Préparation et purification des anticorps anti-progestérone

5.3.1. Préparation de l'immunogène

La progestérone 11 α -hemisuccinate (P11HS) a été couplée à la sérumalbumine bovine (BSA) en utilisant la méthode dite « ester-activé ». Elle consiste à préparer un dérivé ester-activé du stéroïde à partir du dérivé à fonction carboxylique puis à coupler ce dérivé ester-activé avec la protéine support (BSA).

Dans une solution composée de 400 μl de diméthylformamide (DMF) et 400 μl de 1,4-dioxane, on dissout 12 mg du P11HS. On y ajoute ensuite 200 μl d'une solution d'eau distillée contenant 12 mg du N-hydroxysuccinimide (NHS) et 24 mg du 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC-HCl). Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) sous faible agitation pendant une nuit. Après clarification par centrifugation (15000 x g pendant 5 min), le dérivé de la progestérone ester-activé contenu dans le surnageant est ajouté délicatement à 4 ml d'une solution contenant 42 mg de BSA dans le tampon borate de sodium, sur un bain de glace et sous faible agitation. Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant une nuit à 4°C . Le conjugué obtenu (P11HS-BSA) est dialysé contre 2 x 5 l du tampon PBS pendant une nuit à 4°C . Il constituera ainsi l'immunogène de la progestérone.

5.3.2. Protocole d'immunisation

2 mg de l'immunogène préparé (P11HS-BSA) dans 500 μl du tampon PBS sont mélangés avec 500 μl de l'adjuvant incomplet de Freund. Le mélange est agité vigoureusement pendant 10 min puis injecté par voie sous-cutanée à un lapin de race *Albinos* (2 kg). Après 21 jours, une 2^{ème} injection rappelle avec 2 mg de l'immunogène dans 1 ml d'eau physiologique est effectuée. 7 jours après, on procède au prélèvement de 50 ml de sang du lapin et à une 3^{ème} injection rappelle avec 2 mg de l'immunogène dans 1 ml d'eau physiologique. Un 2^{ème} prélèvement de 50 ml de sang du lapin est alors effectué 7 jours après.

Le sang prélevé est déposé dans une étuve à 37°C pendant 1 h avant d'être placé au réfrigérateur à 4°C pendant une nuit. Après élimination du coagulum, l'antisérum est récupéré après centrifugation à 4000 x g pendant 15 min.

5.3.3. Purification des anticorps anti-progestérone

La purification des anticorps anti-progestérone a été effectuée, à partir de l'antisérum, par chromatographie d'affinité en utilisant comme support le gel d'agarose Affigel 10 (Biorad, Hercules, CA, USA) et comme ligand la P11HS.

5 ml du gel d'agarose (Affigel 10) dans 5 ml d'isopropanol sont incubés avec 60 µl d'éthylène diamine dans 300 µl de DMF pendant 30 min à température ambiante sous faible agitation. Après plusieurs lavages à l'isopropanol, le gel est repris à volume égal dans l'isopropanol. Le ligand (P11HS) est couplé ensuite au support en utilisant le même protocole décrit précédemment pour le couplage de la P11HS à la BSA (méthode ester-activé).

L'antisérum est incubé, par la suite, avec le gel d'agarose activé en *batch* pendant une nuit à 4°C sous faible agitation. Après lavage au tampon PBS du gel introduit dans une colonne (1 × 10 cm), l'éluion est effectuée avec une solution de glycine à 0,1 M (pH 2,5). Les fractions (1 ml) contenant les anticorps anti-progestérone sont récupérées dans des tubes contenant 100 µl d'une solution de Tris-HCl (1 M, pH 9). Ces fractions sont ensuite regroupées puis dialysées contre 2 × 5 l du tampon PBS pendant une nuit à 4°C. Elles constitueront la solution mère d'anticorps anti-progestérone.

5.4. Préparation des plaques ELISA revêtues d'anticorps anti-progestérone

A partir de la solution mère d'anticorps anti-progestérone conservée à -20°C, on prépare une dilution au 1/1000 dans le tampon de « *coating* ». 50 µl de la solution d'anticorps diluée (1 µg) sont mis en incubation pendant 24 h à température ambiante dans un puits approprié d'une plaque ELISA. On travaille dans des plaques de microtitration à 96 puits (MaxiSorp, Nunc) qui permettent de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément. Les solutions contenues dans les puits sont par la suite ôtées par aspiration, puis remplacées par 300 µl/puits du tampon de saturation. Les plaques sont ensuite remises en incubation pendant 24 h à température ambiante. Les puits ainsi revêtus d'anticorps anti-progestérone sont aspirés, puis séchés pendant 30 min à 37°C sous vide dans un lyophilisateur.

5.5. Préparation du traceur enzymatique

Le traceur enzymatique a été préparé par le couplage du dérivé de la progestérone à fonction carboxylique P3CMO avec la peroxydase (HRP) selon un protocole identique à celui utilisé pour la préparation de l'immunogène. Le conjugué obtenu (P3CMO-HRP) est dialysé pendant une nuit à 4°C contre 2 × 5 l du tampon phosphate puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Une reconstitution est nécessaire après dans le tampon PBS contenant 0,03% (v/v) de Proclin 300 et 0,005% (p/v) de sulfate de gentamicine pour obtenir un traceur de concentration de 25 ng/ml.

5.6. Préparation de la gamme standard de progestérone

La gamme standard est préparée par surcharge de progestérone (Promega) de 0 à 30 ng/ml dans un pool de sérum de bouc déplété (sérum « zéro »). La déplétion du sérum de bouc est

réalisée sur charbon actif à raison de 5% (p/v) pendant 48 h à 4°C. Le charbon actif est ensuite éliminé par centrifugation (4000 x g pendant 30 min) suivie d'une filtration sur membrane (0,22 µm). La matrice déplétée est surchargée de progestérone à différentes concentrations pour préparer les solutions « étalons » de notre gamme (Tableau 2).

Tableau 2 : Solutions « étalons » de la gamme standard du kit EIA mis au point

Solution « étalon »	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Concentration (ng/ml)	0	0,12	0,94	3,75	7,50	15	30

Ces solutions « étalons » sont conservées en présence de 0,005% (p/v) de sulfate de gentamicine à 4°C jusqu'à utilisation.

5.7. Préparation des solutions de lavage, de révélation et d'arrêt

La solution de lavage est constituée de 3,02 g/l Tris-HCl ; 2,16 g/l NaCl ; 0,04 g/l MgCl₂ et 0,05% (v/v) Tween (pH 7,4). La solution de révélation est constituée de tétraméthylbenzidine (TMB) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La solution d'arrêt est constituée de 0,1 M de d'acide sulfurique (H₂SO₄).

6. PROCEDURE D'UTILISATION DU KIT

6.1. Montage du dispositif de dosage

Nous avons opté pour le montage dit « en format hétérologue » pour la mise au point du kit EIA de dosage de la progestérone dans le sérum des caprins. Ce choix est consolidé par les nombreux arguments cités dans la littérature en faveur de ce type de montage pour le dosage des stéroïdes. Par conséquent, les anticorps anti-progestérone qui sont utilisés dans notre système de dosage sont ceux produits contre l'immunogène conjugué à la (P11HS-BSA), alors que le traceur enzymatique qui est employé est celui conjugué à la position 3 de la progestérone (P3CMO-HRP).

6.2. Dosage de la progestérone par le kit EIA développé

A partir de chaque standard de la gamme étalon locale de la progestérone (ou d'échantillon de sérum caprin), on dépose 50 µl dans un puits correspondant de la plaque ELISA revêtue d'anticorps anti-progestérone. On ajoute par la suite, dans chaque puits, 50 µl de la solution contenant le traceur enzymatique de la progestérone. Après incubation pendant 2 h à température ambiante sous faible agitation, les puits sont aspirés, puis lavés avec 300 µl de la solution de lavage. Cette opération est répétée 2 fois afin d'éliminer complètement le traceur non lié. La révélation est initiée ensuite par ajout dans chaque puits de 50 µl de la solution de révélation contenant le TMB qui est un substrat de la peroxydase. Après 15 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la réaction est arrêtée par ajout de 50 µl de la solution d'arrêt. La lecture se fait, immédiatement après, à 450 nm dans un lecteur ELISA.

6.3. Exploitation des résultats

Les résultats obtenus en termes de densités optiques sont ensuite convertis en pourcentages de liaison par rapport à l'activité enzymatique maximale enregistrée en absence de progestérone libre (B/B_0).

En représentant le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) calculé pour chaque standard en fonction du logarithme de la concentration en progestérone correspondante, nous obtiendrons la représentation classique de la courbe d'étalonnage de notre système de dosage enzymo-immunologique de la progestérone mis au point localement. Une autre représentation de cette courbe d'étalonnage peut aussi être établie ; cette représentation dite « Logit-Log » consiste à tracer « $\text{Log}(B/B_0 - B) = f(\text{Log}[\text{Progestérone}])$ ».

7. VALIDATION ANALYTIQUE DU KIT

7.1. Etablissement de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage obtenue après le montage du dispositif et la réalisation des mesures révèle, que ça soit en représentation classique (Figure 1A) ou en représentation « Logit-Log » (Figure 1B), une évolution décroissante proportionnelle entre la concentration de la progestérone et le signal du chromogène enregistré, avec un coefficient de détermination linéaire R^2 de l'ordre de 0,9996 (Figure 1).

7.2. Evaluation de la sensibilité et de la limite de détection

La sensibilité, définie comme étant la concentration pour laquelle le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) est égale à 50% (IC_{50}) et la limite de détection, définie comme étant la plus petite concentration différente de 0 avec une probabilité de 95%, ont été déterminées à partir des résultats obtenus. Les valeurs de celles-ci sont représentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Sensibilité et limite de détection du kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum des caprins

	Valeurs (ng/ml)
Gamme de mesure	[0 – 30]
Sensibilité	2,45 ± 0,15
Limite de détection	0,05 ± 0,01

Ces résultats extrêmement satisfaisants et compatibles avec les taux sériques physiologiques de progestérone observés au cours du cycle œstral des caprins qualifient fortement l'usage de ce kit EIA mis au point afin de déterminer l'état physiologique des chèvres, notamment lors du suivi de l'insémination artificielle et du diagnostic précoce de la gestation et de l'infertilité.

7.3. Evaluation de la spécificité

La spécificité a été évaluée par rapport à plusieurs analogues structuraux de la progestérone (testostérone, cortisol, estradiol, 17 α -Hydroxyprogestérone, 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, 5 α -Pregnane-3,20-dione, 5-Pregnen-3 β -ol-20-one). La méthode adoptée est de déterminer le pourcentage des réactions croisées (indice d'Abraham). Des gammes de 1 à 1000 ng/ml de ces stéroïdes ont été établies dans le sérum caprin « zéro ». Le dosage EIA a été conduit dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment en incluant dans chaque plaque une gamme de progestérone préparée en sérum caprin. Pour chacun des stéroïdes testés, la concentration à 50% de liaison a été évaluée (IC₅₀). Le rapport entre cette concentration et la concentration de progestérone à 50% de liaison a ensuite été établi. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Spécificité du kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum des caprins

Stéroïdes	Réactivité croisée (%)
Progestérone	100
Testostérone	1,6
Cortisol	0,8
Estradiol	0,5
17 α -Hydroxyprogestérone	< 0,1
17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one	< 0,1
5 α -Pregnane-3,20-dione	18,4
5-Pregnen-3 β -ol-20-one	1,2

Ces résultats montrent que le kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum caprin est spécifique par rapport à tous les analogues structuraux de la progestérone testés à l'exception du 5 α -pregnan-3,20-dione qui est un métabolite hépatique direct de la progestérone. Toutefois, les concentrations circulantes de ce métabolite de la progestérone restent négligeables devant celle de la progestérone.

7.4. Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité

La répétabilité, qui exprime la variation des résultats obtenus sous conditions identiques (variation intra-essai), et la reproductibilité, qui exprime la variation des résultats obtenus sous conditions différentes (variation inter-essai), ont été évaluées selon les méthodes décrites par Caporal-Gautier et al. (1992) et Albrecht et al. (2004). Les dosages ont été effectués par 3 manipulateurs effectuant 6 mesures pour chaque étalon et/ou échantillon. Les coefficients de variation (CV) intra-essai et inter-essai sont par la suite calculés pour évaluer respectivement, la répétabilité et la reproductibilité. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Critères de fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la gamme étalon du kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum caprin

Concentration attendue (ng/ml)	Concentration moyenne mesurée (ng/ml)	CV intra-essai (%)	CV inter-essai (%)	Taux de recouvrement
0,12	0,13	10,71	12,46	96,06
0,94	0,97	8,45	11,85	109,34
3,75	3,81	5,46	9,47	111,54
7,50	7,68	4,82	8,28	107,31
15,00	14,71	3,75	4,19	95,26
30,00	29,52	4,94	5,76	98,89

Ces résultats montrent que les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité (CV intra-essai et CV inter-essai), calculés pour les différents standards de la gamme étalon, ne dépassent pas 12,5%, ce qui témoigne de l'homogénéité des variances entre les 3 groupes de mesures et aussi à l'intérieur de chaque groupe. D'autre part, les taux de recouvrement exprimant l'exactitude obtenus sont compris entre 95 et 115% pour tous les étalons de la gamme standard. Par conséquent, les différences enregistrées entre les concentrations réelles de la progestérone et celles attendues ne sont pas significatives.

8. CONCLUSION

Pour mettre au point le kit EIA pour le dosage de la progestérone dans le sérum des caprins, nous avons produit des anticorps polyclonaux anti-progestérone hautement spécifiques. Ceci est rendu possible grâce au recours à certaines techniques chimiques de couplage qui nous ont permis de préparer l'immunogène nécessaire. Les anticorps anti-progestérone produits ont été purifiés par chromatographie d'affinité puis immobilisés sur des plaques ELISA de microtitration par adsorption physique.

D'autre part et en utilisant les mêmes techniques chimiques de couplage, nous avons pu préparer le traceur enzymatique de notre kit de dosage EIA. Ce traceur n'est autre qu'un conjugué de la progestérone à la peroxydase.

La préparation de la gamme étalon de notre kit, quant à elle, a été effectuée sur sérum de bouc déplété comme matrice de dosage afin de reproduire au mieux les conditions dans lesquelles sera utilisé notre système de dosage. Cette matrice a été surchargée par la progestérone à différentes concentrations dans une gamme allant de 0 à 30 ng/ml.

Les différents constituants de notre système de dosage ainsi préparés ont été utilisés ensuite dans un dispositif direct en format hétérologue pour réaliser des dosages. Le test développé relativement simple et pratique consiste à additionner directement l'échantillon de sérum caprin avec le conjugué enzymatique au micro-puits revêtu d'anticorps anti-progestérone. Il ne nécessite qu'environ 2 h pour son accomplissement. Après incubation et lavage, 15 minutes d'incubation supplémentaires avec le substrat sont nécessaires pour obtenir le résultat.

Les performances analytiques enregistrées par ce dispositif de dosage se sont montrées intéressantes et compatibles avec les taux sériques physiologiques observés chez les caprins. La sensibilité du dosage a été évaluée à 2,45 ng/ml et sa limite de détection à 0,05 ng/ml.

Le dosage de la progestérone mis au point est spécifique à l'exception d'un métabolite hépatique direct de la progestérone caractérisé par la disparition d'une double liaison entre 2 atomes de carbone, le 5 α -pregnan-3, 20-dione. Les concentrations circulantes de ce métabolite de la progestérone très souvent reconnu par les anticorps anti-progestérone restent toutefois négligeables devant celle de la progestérone.

Les résultats de la validation analytique ont montrés une parfaite linéarité de la gamme étalon avec des coefficients de variation de répétabilité (intra-essai) et de reproductibilité (inter-essai) ne dépassant pas la limite d'acceptation et des taux de recouvrement compris entre 95 et 115%.

Par ce travail, l'objectif prédéfini de mettre au point un kit de dosage enzymo-immunologique (EIA) de la progestérone chez la chèvre a été atteint. Ce kit de dosage, mis au point localement au Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), constituera un outil de choix pour le diagnostic et de suivi de la gestation chez les caprins d'élevage au Maroc.

9. CONDITIONS DE STOCKAGE ET D'UTILISATION

- Tous les constituants du kit doivent être conservés à 4°C jusqu'à utilisation et la plaque de microtitration doit être conservée dans un sac scellé.
- La plaque de microtitration ouverte doit être conservée à 4°C dans un sachet en aluminium avec des dessiccants pour minimiser l'exposition à l'humidité de l'air.
- Un lecteur ELISA ayant une largeur de bande inférieure ou égale à 10 nm et une plage de densité optique de 0 à 3 (à 450 nm) est acceptable pour mesurer l'absorbance.
- Ramener tous les réactifs et la plaque à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant utilisation. Les puits inutilisés doivent être conservés à 4°C à l'abri de la lumière.
- Diluer la solution de lavage concentrée (30 ml) dans de l'eau désionisée ou distillée pour préparer 300 ml du tampon de lavage. Si des cristaux se forment dans la solution de lavage concentrée, chauffer à température ambiante et mélanger doucement jusqu'à dissolution complète des cristaux.
- Il est recommandé que tous les étalons et échantillons soient dosés en double. Tous les réactifs doivent être ajoutés directement au niveau du liquide dans le puits. La pipette ne doit pas toucher la paroi interne du puits.

10. LIMITES D'UTILISATION DU KIT

- L'utilisation du kit doit s'opérer dans les 6 mois suivant sa préparation.
- Ne pas mélanger ou substituer des réactifs avec ceux d'autres sources.
- Les échantillons présentant un trouble, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.

- Si les échantillons génèrent des valeurs supérieures à celle de l'étalon le plus élevé, diluer les échantillons et répéter le test.
- Toute variation de la technique de pipetage, de la technique de lavage, du temps ou de la température d'incubation peut entraîner une variation de la liaison.

11. RECOMMANDATIONS TECHNIQUES

- Centrifuger les flacons avant de les ouvrir pour recueillir le contenu.
- Lors du mélange ou de la reconstitution des solutions, éviter la formation de mousse.
- Pour éviter la contamination croisée, changez les embouts de pipette entre les ajouts de solutions « étalons », les ajouts d'échantillons et les ajouts de réactifs.
- Lors de l'utilisation d'un laveur de plaque automatique, une période d'incubation de 30 secondes après l'ajout de la solution de lavage et/ou la rotation de la plaque de 180 degrés entre les étapes de lavage peut améliorer la précision du dosage.
- Pour obtenir des résultats précis, s'assurer de l'absence de bulles d'air dans les puits de la plaque pendant les étapes d'incubation.
- La solution de révélation doit rester incolore ou bleu clair jusqu'à ce qu'elle soit ajoutée à la plaque. Conserver la solution de révélation à l'abri de la lumière. La solution de révélation doit passer du bleu incolore ou bleu clair au bleu foncé.
- La solution d'arrêt doit être ajoutée à la plaque dans le même ordre que la solution de révélation. La couleur développée dans les puits passera du bleu au jaune lors de l'ajout de la solution d'arrêt. Les puits de couleur verte indiquent que la solution d'arrêt n'est pas bien mélangée avec la solution de révélation.

12. REVENDICATIONS

1. Un kit enzymo-immunologique pour le dosage quantitatif *in vitro* de la progestérone dans le sérum des caprins. Ce kit permet le dosage précis et spécifique de la progestérone dans le sérum caprin grâce à l'utilisation d'un procédé basé sur un schéma réactionnel de type « compétition » avec un montage en format « hétérologue » ; utilisant (i) des anticorps polyclonaux de lapin produits contre un immunogène conjugué à la position 11 de la progestérone et (ii) un traceur enzymatique conjugué à la position 3 de celle-ci. Le dosage est effectué dans une matrice spécifique aux caprins. Ce procédé de dosage consiste en :
 - a. Une application directe des échantillons de sérum caprin sur la plaque ELISA revêtue d'anticorps anti-progestérone.
 - b. Une incubation durant 2 h à température ambiante en présence du traceur enzymatique qui entre en compétition avec la progestérone libre vis-à-vis des anticorps.
 - c. Une incubation durant 15 min en présence du substrat enzymatique.
 - d. Une mesure de la densité optique développée par spectrophotométrie à 450 nm.
 - e. Une quantification précise de la concentration en progestérone par rapport à une gamme étalon.
2. Le kit selon la revendication 1, est caractérisé par l'utilisation d'anticorps anti-progestérone produits chez le lapin contre un immunogène préparé par le couplage de la sérumalbumine bovine avec la progestérone à partir de la position 11 (progestérone 11 α -hemisuccinate – sérumalbumine bovine). Ces anticorps sont rendus monospécifiques grâce à une purification par chromatographie d'affinité sur gel d'agarose greffé de la progestérone à la position 11.
3. Le kit selon la revendication 1, est caractérisé par l'utilisation d'un traceur enzymatique préparé par le couplage de la peroxydase avec la progestérone à partir de la position 3 (progestérone 3-(O-carboxyméthyl) oxime – peroxydase).
4. Le kit selon la revendication 1, est caractérisé par une gamme standard préparée dans une matrice de sérum de bouc déplété avec du charbon actif pour réduire le bruit de fond et mieux reproduire les conditions dans lesquelles sera utilisé le kit. Cette gamme est composée d'une série de dilutions de la progestérone compatible avec les taux sériques physiologiques observés au cours du cycle œstral des caprins (de 0 à 30 ng/ml).
5. Le kit selon les revendications 1 à 4, présente une forte sensibilité de l'ordre de 2,45 ng/ml et une faible limite de détection de l'ordre de 0,05 ng/ml. Sa validation analytique révèle des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ne dépassant pas 12,5% et des taux de recouvrement compris entre 95 et 115%.
6. Le kit selon les revendications 1 à 5, présente une spécificité élevée pour la progestérone vis-à-vis de ses analogues structuraux suivants : testostérone, cortisol, estradiol, 17 α -Hydroxyprogestérone, 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one et 5-Pregnen-3 β -ol-20-one, qui présentent, respectivement, des réactions croisées faibles de l'ordre de 1,6% ; 0,8% ; 0,5% ; <0,1% ; <0,1% ; 18,4% et 1,2 %.

7. Le kit selon les revendications 1 à 6, permet en plus de la détermination de l'état physiologique des chèvres et du diagnostic précoce de la gestation dès les 21 - 22^{ème} jours après la saillie ou l'insémination artificielle, le diagnostic de certaines anomalies ou pathologies pouvant affecter le système reproductif des chèvres ainsi que le suivi des traitements thérapeutiques et/ou progestatifs grâce au dosage quantitatif de la progestérone sérique.

14. DESSINS

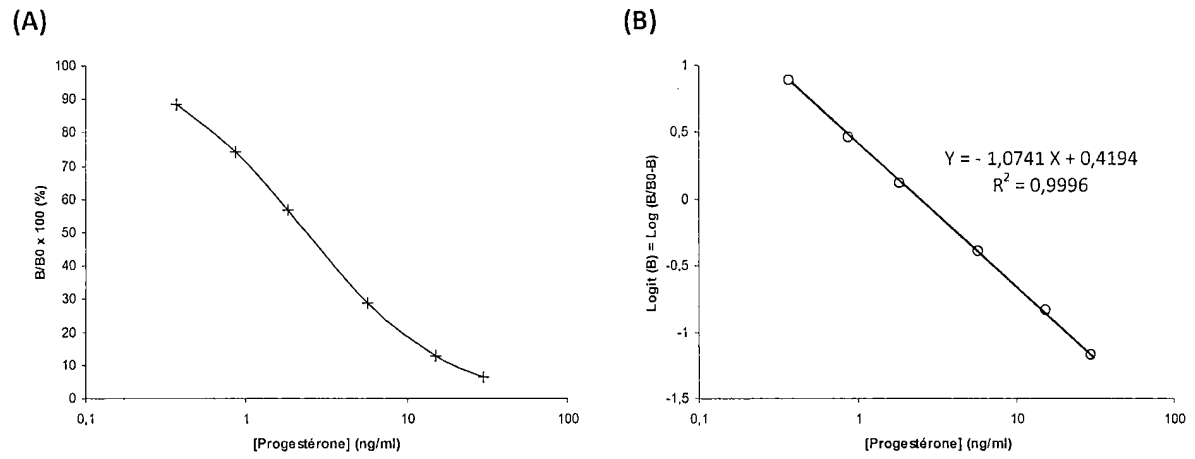


Figure 1 : Courbe d'étalonnage en représentation classique **(A)** et Logit-Log **(B)** du kit EIA mis au point pour doser la progestérone dans le sérum des caprins

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



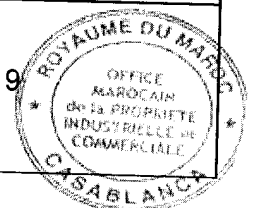
المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION
SUR LA BREVETABILITE**

Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 42070	Date de dépôt : 27/02/2018
Déposant : CENTRE NATIONAL DE L'ENERGIE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES NUCLÉAIRES (CNESTEN)	
Intitulé de l'invention : KIT ENZYMO-IMMUNOLOGIQUE POUR LE DOSAGE DE LA PROGESTERONE DANS LE SERUM DES CAPRINS	
Classement de l'objet de la demande : CIB : G 01N 33/00	
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	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <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: B.SADIKI	Date d'établissement du rapport : 13/11/2019
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	



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

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

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
 - Revendications
7
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 5: Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté (N)	Revendications 1-7 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-7 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-7 Revendications aucune	Oui Non

D1 : WO9412883

1. Nouveauté (N) :

Aucun document ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-7. Par conséquent, l'objet de celles-ci est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 est considéré comme étant l'art antérieur le plus proche de l'objet des revendications 1-7. Il divulgue un procédé pour la détermination qualitative / semi-quantitative de la progestérone dans un fluide biologique selon le principe ELISA adapté à un test rapide pour la détection simple du temps d'insémination et de conception et de suivi de la grossesse des animaux domestiques afin d'éviter les diagnostics et les interprétations erronés.

L'objet de la première revendication diffère du document D1 en ce que le procédé revendiqué est spécifique aux caprins.

Le problème peut être considéré comme la fourniture d'un nouveau procédé pour le dosage de la progestérone chez les caprins.

La solution que la présente demande propose est considérée comme inventive pour les raisons suivantes :

- Le montage hétérologue des anticorps mono-spécifiques purifiés utilisé dans le procédé de la présente demande a montré une spécificité améliorée même en absence de toute dilution ce qui a permis une quantification plus précise de la concentration de la progestérone.
- L'homme du métier pour chercher à résoudre le problème à partir de D1, ne saurait pas que la modification apportée au procédé de D1 aboutirait à un procédé amélioré.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 et des revendications dépendantes 2-7 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.