

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 47829 B2** (51) Cl. internationale : **A61B 5/00**

(43) Date de publication :
31.03.2022

(21) N° Dépôt :
47829

(22) Date de Dépôt :
27.12.2019

(71) Demandeur(s) :
**Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR),
Rabat Design Center, Rue Mohamed Al Jazouli, Madinat Al Irfane, 10100 Rabat (MA)**

(72) Inventeur(s) :
MOUMEN ABDELADIM ; EL HADI HICHAM

(74) Mandataire :
AMMANI ABDELHAQ

(54) Titre : **Kit pour le diagnostic moléculaire de la charge virale du virus de l'hépatite B.**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type B (VHB) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'une nouvelle combinaison de set d'amorces ciblant les gènes C, preC, S du virus de l'hépatite B avec un autre set ciblant un ADN control interne. L'invention porte sur la combinaison pour la première fois de ces sets d'amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'une région spécifique au niveau du génome du VHB couplé à la détection du control interne présent naturellement dans le sang humain en utilisant la méthode de PCR en temps réel (qPCR). Cette invention préconise aussi l'utilisation d'un plasmide bactérien, contenant une séquence nucléotidique d'une taille de 1900 paires de base (pb) se situant dans la région conservée des gènes C, pre C, S du VHB, pour la construction d'une gamme étalon (courbe standard) servant à la détection et la quantification fiable du VHB par des nouveaux sets d'amorces et de sondes. En plus de la région spécifique des gènes C, pre C, S, le kit permet la détection d'une région d'une séquence spécifique du gène RPL30 et/ou GAPDH qui est utilisé comme contrôle interne (IPC).

Résumé de l'invention

La présente invention concerne un kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type B (VHB) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'une nouvelle combinaison de set d'amorces ciblant les gènes C, preC, S du virus de l'hépatite B avec un autre set ciblant un ADN control interne. L'invention porte sur la combinaison pour la première fois de ces sets d'amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'une région spécifique au niveau du génome du VHB couplé à la détection du control interne présent naturellement dans le sang humain en utilisant la méthode de PCR en temps réel (qPCR). Cette invention préconise aussi l'utilisation d'un plasmide bactérien, contenant une séquence nucléotidique d'une taille de 1900 paires de base (pb) se situant dans la région conservée des gènes C, pre C, S du VHB, pour la construction d'une gamme étalon (courbe standard) servant à la détection et la quantification fiable du VHB par des nouveaux sets d'amorces et de sondes. En plus de la région spécifique des gènes C, pre C, S, le kit permet la détection d'une région d'une séquence spécifique du gène RPL30 et/ou GAPDH qui est utilisé comme contrôle interne (IPC).

Kit pour le diagnostic moléculaire de la charge virale du virus de l'hépatite B.**DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention concerne le domaine du diagnostic médical. Elle concerne en particulier
5 un kit de diagnostic moléculaire pour l'amplification, la détection et la quantification, d'un ou
de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type B (VHB) utilisant la technique de la
PCR en temps réel (qPCR).

ART ANTERIEUR

10 L'hépatite B est une maladie du foie qui est due à l'infection par le virus VHB qui est un
virus à ADN de la famille des Hépadnavirus. A l'instar du SIDA, l'hépatite B est considérée
par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un problème majeur de santé
publique. Environ 2 milliards de personnes (un tiers de la population mondiale) ont des
15 marqueurs sérologiques indiquant l'existence d'une infection ancienne (et guérie) ou une
infection chronique (persistante) par le virus de l'hépatite B (VHB), et environ 350 millions
de personnes ont une infection chronique par le VHB.

Au Maroc selon l'OMS, on estime à près de 850.000 personnes infectées par le virus de
l'hépatite B et 400.000 atteintes par le virus de l'hépatite C (VHC) et l'hépatite B (VHB).

A l'échelle mondiale plus de 780 000 personnes meurent chaque année des conséquences
20 aiguës ou chroniques de l'hépatite B (, ce taux de mortalité est lié au risque d'évolution vers
une cirrhose (25 %) avec le risque de complications létales (insuffisance hépatique grave
ou carcinome hépatocellulaire) responsables de plus d'un million de morts par an dans le
monde. Le carcinome hépatocellulaire est un des cancers les plus fréquents dans le monde et le
VHB est responsable de 75 % de ces cancers.

25 Un vaccin contre cette maladie est disponible depuis 1982. Il est efficace à 95% pour prévenir
l'infection et ses conséquences chroniques. Il s'agit du premier vaccin mis au point contre l'un
des principaux cancers humains.

Le virus de l'hépatite B se transmet principalement par voie sexuelle ou sanguine. En effet,
les seules sécrétions ou liquides corporels qui permettent de transmettre le virus sont le

sang, le sperme, les sécrétions vaginales, la salive et les liquides issus d'une plaie. Pour qu'il y ait transmission, il faut donc qu'un de ces liquides chez le malade passe dans le sang d'une personne saine. La transmission de la mère à l'enfant est aussi possible mais un traitement précoce par immunoglobulines suivi d'une vaccination permet d'éviter la maladie.

- 5 Le VHB est un virus à ADN caractérisé par une variabilité génétique à l'origine d'une classification en 7 génotypes (A à G). Cinq autres génotypes du VHB appartenant également à la famille des hepadnaviridae ont été isolés chez différents singes, orang-outan, gorille, chimpanzé, sans encore avoir jamais été isolé chez l'homme. Cette classification génotypique a remplacé la précédente classification sérologique en 9 sous-types.
- 10 La répartition des génotypes humains du VHB à travers le monde est ubiquitaire. Le génotype A est présent dans tous les continents, les génotypes B et C principalement en Asie, le génotype D surtout dans le sud de l'Europe, en Amérique et en Australie, le génotype E en Afrique, le génotype F chez les natifs d'Amérique et de Polynésie, et le génotype G en Europe et aux Etats-Unis.
- 15 Au Maroc une étude de la diversité génétique des souches du VHB a montré une prédominance du génotype D.

Les outils virologiques utiles pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique des hépatites virales liées au virus de l'hépatite B (VHB) sont à la fois sérologiques et moléculaires. A côté des tests classiques de détection des antigènes viraux et des anticorps

20 dirigés contre eux les techniques de PCR en temps réel permettent aujourd'hui une quantification plus sensible et plus précise de l'ADN viral et remplacent les techniques précédemment utilisées dans la plupart des laboratoires de virologie. Les techniques de PCR en temps réel sont plus sensibles que les techniques classiques (seuil inférieur de détection de l'ADN VHB de l'ordre de 10 à 30 unités internationales : UI/mL) et bénéficient d'un

25 intervalle de quantification linéaire plus étendu ce qui permet une quantification précise des charges virales élevées comme des charges virales basses observées sous traitement, faisant de ces techniques l'instrument de choix du suivi de la réponse virologique à une thérapie. Enfin, les techniques de PCR en temps réel permettent l'expression des résultats en UI/mL, indispensable pour la standardisation des résultats et l'émission de recommandations

30 pratiques largement applicables.

Différentes solutions sont divulguées dans l'état de l'art. Le document EP1513958_B1 divulgue un kit de diagnostic de l'hépatite B utilisant un set de séquences et un contrôle interne constitué par l'ajout d'une séquence d'ARN avant purification.

La solution de ce document nécessite donc l'intervention de l'utilisateur pour introduire le
5 contrôle interne via l'ajout avant l'étape de l'extraction d'acide nucléique.

D'où l'intérêt de la présente invention qui présente une solution alternative basée sur un contrôle interne utilisant un gène existant dans le sérum humain en plus d'un SET d'amorces différents qui permet la détection du génome du virus HBV de manière plus sensible et plus spécifique.

10 EXPOSE DE L'INVENTION

Le kit selon l'invention se compose d'un set d'amorces et de sondes ciblant des régions conservées du VHB appelée C, preC, d'un set de séquences spécifiques du gène RPL30 et/ou GAPDH qui sera utilisé comme contrôle interne (IPC). Cette amplification sera réalisée sur des échantillons biologiques et sur un vecteur plasmidique contenant des séquences
15 nucléotidiques se situant dans les régions C, preC, S d'une taille de 1900pb. L'amplification du vecteur plasmidique constituera une gamme étalon permettant la quantification absolue de la charge virale dans l'échantillon biologique à tester.

Les régions C, preC, S du VHB contiennent les séquences les plus conservées du génome. Son haut degré de conservation en fait une région de choix pour la sélection d'amorces utilisées
20 lors de l'amplification de l'ADN du VHB par PCR conférant ainsi à la technique une excellente sensibilité pour une application diagnostic.

Les sets d'amorces et de sondes de la région cible conservée du VHB et de l'IPC seront utilisées en PCR en temps réel (qPCR) en format simplex ou multiplex pour une quantification fiable, rapide et moins coûteuse.

25 De manière plus spécifique, la présente invention fait référence à un procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du virus de l'hépatite B (VHB) dans un échantillon de patient en utilisant une nouvelle combinaison de sondes et amorces entre le gène cible du virus du VHB et un IPC par les méthodes de PCR ou de qPCR.

En plus des gènes cible C, preC et S, le kit amplifie une autre séquence dite contrôle interne
30 positif de la réaction (IPC) qui est une région du gène RPL30 et/ou GAPDH présents

naturellement dans le sang humain. L'amplification de l'IPC permet de s'assurer du bon déroulement de toutes les étapes en amont de l'amplification par PCR. L'amplification de l'IPC est primordiale pour l'analyse des résultats. Tout résultat est ininterprétable si l'IPC n'est pas amplifié pendant la réaction.

- 5 Le procédé de la présente invention représente une amélioration des autres méthodes antérieures et permet :
- a) d'utiliser un IPC innovant correspondant à des séquences de gène RPL30 et/ou GAPDH, à la place des fragments d'ADN ou d'ARN qui, dans les kits disponibles, sont souvent ajoutés à l'échantillon à tester avant de procéder à l'extraction d'ADN, et retrouvés vers la fin de l'expérience dans l'étape d'analyse des courbes, témoignant du bon déroulement de toutes les étapes. L'innovation dans notre kit consiste en la détection, en plus de la séquence virale, des séquences du gène RPL30 et/ou GAPDH qui sont naturellement présentes dans le sang des patients. Cette innovation permet de réduire la quantité des consommables utilisés et gagner en temps en réduisant le nombre des étapes nécessaires à la réalisation du test
 - 15 b) de gagner en spécificité et en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces plus spécifiques et plus sensibles
 - c) de détecter, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, toutes les variantes virales du VHB, étant donné que les sondes et amorces de la présente invention sont conçues de telle manière à détecter tous les génotypes décrits jusqu'à présent, ce qui permettra un gain
 - 20 supplémentaire en spécificité

Selon la présente invention, la détection et la quantification des transcrits des gènes cibles se font par la méthode PCR en différentes étapes :

- a) Conception et synthèse des nouvelles séquences nucléotidiques de sondes et d'amorces qui s'hybrident spécifiquement sur l'IPC, les régions cibles du virus et sur la séquence nucléotidique clonée dans un plasmide bactérien,
- 25 b) le contrôle positif interne (IPC) consiste en une séquence spécifique du gène RPL30 et/ou GAPDH humain présente naturellement dans le sang des patients malades et sains.
- c) la quantification plus sensible et plus spécifique des transcrits de la région cible C, preC et S, se fait par une extrapolation du nombre de copie des transcrits des gènes cibles à partir

d'une gamme étalon(courbe standard) par quantification absolue en utilisant un plasmide bactérien contenant une séquence nucléotidique synthétisée

Selon une autre caractéristique de la présente invention, la séquence nucléotidique synthétisée et qui va être clonée dans un plasmide bactérien a une séquence nucléotidique SEQ ID 01.

5 En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient les transcrits de la région cible C, preC et S, du VHB dans un échantillon biologique incluent :

a) une amorce «forward cible» ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO02 à SEQ ID NO08 et une amorce «reverse cible» ayant une séquence parmi les séquences:SEQ ID NO09 à SEQ ID NO15

10 b) Une sonde «probe cible» permettant la détection de la région ciblée dans un échantillon biologique ayant une séquence parmi les séquences :SEQ ID NO16 à SEQ ID NO22

En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient le transcrite de IPC dans un échantillon biologique incluent, a) une amorce «forward IPC» ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO23 à SEQ ID NO24 et une des amorces «reverse

15 IPC» ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO25 à SEQ ID NO26 b) Une sonde «probe IPC» permettant la détection de l'IPC dans un échantillon biologique ayant une séquence parmi les séquences:SEQ ID NO27 à SEQ ID NO28

La présente invention concerne aussi une méthode pour la détection des transcrits de la région cible et de l'IPC dans un même échantillon biologique en simplex ou en duplex. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes,

a) mettre en contact un échantillon biologique avec une amorce «forward cible», une amorce «reverse cible» , une amorce «forward IPC» et une amorce «reverse IPC», dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible,

25 b) détecter dans un même échantillon biologique l'amplification des différentes séquences cibles avec une sonde «probe cible» et la séquence IPC par une sonde «probe IPC».

En accord, avec la présente invention, une sonde contient une unité fluorescente (reporter) attachée à la région 5' d'ADN, en plus d'une partie quencher à la région 3' d'ADN. La quantification de l'unité fluorescence permet la quantification des gènes cibles.

30

En accord avec la méthode d'amplification (PCR ou qPCR) de la présente invention, cette méthode consiste à mettre l'échantillon biologique en contact avec un mélange réactionnel contenant tous les réactifs nécessaires pour la réaction d'amplification.

En accordance aussi avec cette invention, l'amplification des transcrits de la région cible et
5 IPC de la présente invention peuvent se faire en format simplexe ou multiplexe.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn, différents IPC
10 ont été testés pour la même quantité d'ADNc.

Figure 2 : Graphique représentant la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon du plasmide contenant la séquence cible de l'hépatite B pour la quantification absolue d'un échantillon de quantité inconnue. Le nombre de cycle est représenté en fonction du delta RN.

Figure 3 : Graphique représentant la courbe obtenue à partir de la gamme étalon du plasmide
15 contenant la séquence cible de l'hépatite B pour la quantification absolue d'un échantillon de quantité inconnue. Le nombre de cycle est représenté en fonction de la quantité d'ADNc.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un kit d'amplification, de détection et/ou de la quantification,
20 d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type B (VHB) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'une nouvelle combinaison entre les gènes cibles C, preC et Set la détection d'un control interne.

L'invention préconise aussi une méthode d'amplification, de détection et/ou de quantification
25 par PCR ou qPCR, des transcrits des régions conservées cible C, preC et S, et de l'IPC dans un échantillon biologique en utilisant les sets d'amorces et sondes cités précédemment.

Le mot 'VHB' décrit dans la présente invention, représente le virus 'Virus de l'Hépatite B'.

Le mot 'gène C' décrit dans la présente invention, représente la région du génome du virus qui code pour la protéine de core p22c de 22 kDa et une protéine non structurale p17e de 17 kDa (= antigène HBe).

Le mot 'gène S' décrit dans la présente invention, représente la région du génome du virus qui code pour les protéines d'enveloppe. Une protéine S ou protéine majeure de 24 kDa (= antigène HBs), une protéine moyenne de 34 kDa et une grande protéine de 39 kDa.

5 Les régions cibles du VHB contiennent les séquences les plus conservées du génome. Son haut degré de conservation en fait des régions de choix pour la sélection d'amorces utilisées lors de l'amplification de l'ADN du VHB par PCR permettant une excellente sensibilité de la technique pour le diagnostic.

10 Le mot 'IPC' réfère à un gène de contrôle interne dot l'amplification au niveau d'un échantillon teste témoigne du bon déroulement de toutes les étapes en amont de l'amplification par PCR, à savoir l'extraction et la reverse transcription. L'amplification de l'IPC est primordiale pour l'analyse des résultats. Tout résultat est ininterprétable si l'IPC n'est pas amplifié pendant la réaction.

15 Le mot 'gène' utilisé dans la présente invention réfère à une séquence d'acide nucléique de la molécule d'ADN occupant une région précise dans un chromosome et permet de coder les instructions pour la synthèse de l'ARN.

Le mot 'région cible' utilisé dans la présente invention réfère à une longue séquence nucléotidique du génome virale, que nous envisageons de cibler pour la détection et la quantification du VHB dans un échantillon.

20 Le mot 'oligonucléotide' est une séquence composée, d'ADN ou d'ARN, ou leur combinaison avec une longueur qui varie de 10 à 70 nucléotides. Les oligonucléotides sont généralement obtenus par synthèse chimique, sous forme de simple brin.

25 L'amplification comme utilisée ici, réfère à une ou plusieurs méthodes capables de copier un acide nucléique permettant ainsi une augmentation du nombre de copie d'une séquence d'acide nucléique cible. La séquence amplifiée peut être un acide ribonucléotide (ARN) ou un acide désoxyribonucléotide (ADN).

Le mot 'amorçe' réfère à une séquence d'oligonucléotides synthétisée chimiquement ou naturellement. L'amorçe est le point d'initiation de la synthèse d'ADN dans des conditions optimales de température et en présence de d'enzyme, tampons, de nucléotides et de séquences nucléotidiques complémentaires spécifiques.

Le mot 'sonde' cité ici réfère à une séquence nucléotidique qui forme une structure hybride avec une séquence cible dans une molécule d'un échantillon biologique.

Le mot 'PCR' (Polymerase Chain Reaction) utilisé dans la présente invention réfère à une méthode dont un échantillon d'ADNc ou d'ADN est ajouté dans une solution en présence de
5 nucléotides non attachés (exemple les dNTPs), 2 oligonucléotides amorces (forward et reverse); et de l'enzyme ADN polymérase (préférentiellement la Taq polymérase résistant à la chaleur) qui permet la catalyse et la formation d'ADN à partir des 2 amorces et dNTPs. Le mélange réactionnel est chauffé, à 94-96 C° pour dénaturer la molécule d'ADN et former 2
10 brins simples d'ADN. Les amorces vont ensuite se fixer spécifiquement sur l'ADN simple brin permettant ainsi à l'ADN polymérase de catalyser l'attachement des dNTPs aux amorces.

Le mot 'RT-qPCR' (reverse transcriptase-real time PCR) utilisé dans la présente invention représente une méthode de PCR en temps réel.

Le mot 'qPCR' (quantitative PCR ou real time RT-PCR) décrit dans la présente invention représente une méthode de PCR permettant l'étude des produits de la réaction PCR pendant
15 les premières étapes d'amplification de l'ADN. La détection des produits de PCR se fait par des sondes marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Dans ce cas, l'intensité du signal de la fluorescence mesurée au cours la réaction d'amplification est proportionnelle au nombre de
20 produits nouvellement formés (amplicons). La mesure en ADN ou ADNc se fait en logarithme. La détection et la quantification du nombre de copies d'un gène cible présent initialement dans un échantillon biologique par qPCR, est généralement dérivée de son C_T (cycle threshold). Le CT dépend de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon biologique amplifié et correspond au nombre de cycles d'amplification où la
25 courbe d'amplification croise la ligne de seuil. Cette ligne est placée au niveau de la phase exponentielle, de façon à se distinguer clairement du bruit de fond.

Parmi les sondes les plus utilisées en qPCR, nous retrouvons les sondes « molecular beacons » et TaqMan qui utilisent l'activité 5' exonucléase de l'enzyme Taq polymérase pour
30 mesurer la quantité de la séquence d'ADN dans un échantillon biologique.

Préférentiellement, la qPCR de la présente invention utilise les sondes TaqMan et l'analyse d'amplification est faite par un automate de PCR en temps réel pouvant détecter et quantifier des acides nucléiques. La quantité des gènes cibles et des gènes contrôles est calculée par le logiciel intégré dans le système en utilisant soit la méthode de la quantification relative ou absolue par les courbes standard. Selon la présente invention, le reporteur de la sonde peut être FAM, JOE, YAKYE (YY) ou autres et le quencher BBQ, BHQ1, TAMRA ou autres.

Le cycle seuil ' C_T ' utilisé dans la présente invention est le nombre de cycles de PCR pour lequel le niveau de fluorescence atteint le seuil. Une valeur $C_T > 8$ et < 35 est souhaitable. Une valeur $C_T < 8$ montre que la concentration de départ en acides nucléiques utilisée dans la réaction est élevée. Par contre une valeur $C_T > 35$ montre que la concentration de départ en acides nucléiques utilisée dans la réaction est faible.

Le mot 'simplexe' de la présente invention représente un essai qui ne se déroule pas simultanément avec d'autres essais dans le même tube réactionnel. Selon la présente invention, la qPCR en simplexe reflète la détection et la quantification du nombre de copies d'un seul gène dans un tube de réaction.

Le mot 'multiplexe' cité dans la présente invention réfère à un essai qui se déroule simultanément avec au moins un autre essai dans le même tube réactionnel. La qPCR en multiplexe préconise une détection et une quantification du nombre de copies d'au moins 2 gènes dans un même tube de réaction. Selon la présente invention, les 2 gènes en question sont soit des gènes cibles, des gènes contrôles ou un gène cible et un gène contrôle, qui peuvent être détectés simultanément par qPCR.

Le mot 'échantillon biologique' comme décrit dans la présente invention réfère à un fluide corporel, ce fluide peut être un sérum, un plasma, une salive, un éjaculat ou une urine ou un échantillon tissulaire, tumoral ou non, issu d'une biopsie fraîche, fixée ou paraffinée.

En accord avec la présente invention, l'échantillon biologique peut être d'origine humaine ou animal qui peut être amplifié en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

Exemple de Mode de réalisation :

EXPERIENCE: Protocole de qPCR de la présente invention pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du virus de l'hépatite type B.

5 L'extraction de l'ADN à partir du matériel biologique a été faite par le kit « Pure Link Genomic DNA Mini Kit » suivant les recommandations des fournisseurs. La quantité de l'ADN a été mesurée au NanoDrop 2000 Spectro-photometer (Thermo SCIENTIFIC), tandis que la qualité et la pureté de l'ADN obtenues sont testées par électrophorèse sur gel d'agarose et/ou par le Bioanalyzer (Biorad).

10 Chaque couple d'amorces sens (forward), anti-sens (reverse) et la sonde (probe) correspondante aux régions cibles, l'IPCet 5µl d'ADNc de l'échantillon sont ajoutés au master mix de la réaction qPCR pour un volume réactionnel final de 25µl.

Dans le cas de la réaction en format simplexe, seuls la sonde et le couple d'amorces de la région cible ou le contrôle interne sont utilisés dans différent puits de la réaction qPCR ; alors que pour la réaction en format multiplexe au moins deux sondes et deux couples d'amorces de 15 la région cible et/ou le contrôle interne sont utilisés simultanément dans le même puits de la réaction qPCR.

Les conditions du cycle thermal de la qPCR de la présente invention sont divisées en différentes étapes : étape 1 à 95°C pendant 20 secondes; étape 2 (cycle de 50) à 95°C pendant 1 seconde ; et une étape 3 à 60°C pendant 30 secondes.

20 Dans le cas de l'analyse de l'expérience, de la présente invention, la première étape consiste en la vérification de l'amplification de l'IPC, tout résultat est ininterprétable en cas de l'absence de l'amplification de l'IPC. La deuxième étape est la quantification absolue par méthode des courbes standard du transcrit du gène cible. La valeur de l'efficacité de l'amplification (E) est calculée en utilisant la pente de la droite de régression dans la courbe 25 standard. Une pente proche de -3,3 indique une efficacité optimale (100 %) de l'amplification par PCR. La valeur R^2 (coefficient de corrélation) indique la proximité entre la droite de régression et les points de données C_T des réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite de régression et les points de données. Une valeur $R^2 >$ ou égale à 0,99 est souhaitable.

30 Des séries de dilutions des plasmides utilisés dans cette présente invention et des ADN à tester sont nécessaires. Les concentrations utilisées sont 0,125pg, 1,25pg, 12,5pg, 125pg avec

un facteur de dilution égal à 1/10. Pour chaque expérience, chaque point de la gamme étalon est réalisé, au minimum, en duplicata ainsi qu'un contrôle négatif.

Figure 1 : Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn dans un échantillon de patient, différents IPC ont été testés pour la même quantité d'ADNc. Ce graphique a été réalisé en suivant le protocole susmentionné dans lequel la séquence de l'amorce forward correspond à la séquence SEQ ID NO 2 et celle de l'amorce reverse correspond à la séquence SEQ ID NO 9 et la probe est la séquence SEQ ID NO 16 pour la détection génome de l'HBV et les séquences SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 25 et SEQ ID NO 27 comme set d'amorce et probe pour l'identification des IPC.

Figure 2 : Graphique représentant les courbes d'amplification obtenues à partir de la gamme étalon du plasmide contenant la séquence cible de l'hépatite B pour la quantification absolue d'un échantillon de quantité inconnue en utilisant le protocole susmentionné dans lequel la séquence de l'amorce forward correspond à la séquence SEQ ID NO 2 et celle de l'amorce reverse correspond à la séquence SEQ ID NO 9 et la probe est la séquence SEQ ID NO 16 pour la détection génome de l'HBV. La courbe en jaune représente un échantillon de plasma contenant une charge virale HBV inconnue à déterminer. Le nombre de cycle est représenté en fonction du delta RN.

Figure 3 : courbe standard représentant la linéarité de l'amplification et l'efficacité de la PCR en utilisant les SET SEQ ID NO 2 et celle de l'amorce reverse correspond à la séquence SEQ ID NO 9, et la probe est la séquence SEQ ID NO 16 pour la détection génome de l'HBV.

25

30

Les séquences des amorces et des sondes spécifiques utilisées en Figure 1, Figure 2 et Figure 3 sont listées dans les tableaux suivants:

Tableau 1 : séquence nucléotidique contenant la région cible conservée du virus de l’Hépatite B (SEQ ID NO 1):

5

```

ATGGACATTGAcCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
CTTTCCTTCcGTcaGAGATCTcCTAGAcACCGCTCAGCTCTGTATCGaGAAGCCTTAGAgTCTCCTG
AGCATTGcTCACCTCACCaTACTGCACTCAGGCAAGCcATTCTcTGCTGGGGGAAATgATGAcCCCT
CTAGCTACCTGGGTGGGtaaatAATTTGGAAGATCCAgCATCCAGGGATCTAGTAGTCAaTTATGTtAA
tACTcAAcATGGGttTAAAGaTCAGGCAAcTATTGTGGTTTTCAAtaTCTTGcCTtACTTTTTGGAAGA
GAgACTGTacTtGAaTATTTGGTcTCTTcGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCcTATAGACCACC
AAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGAAAcTACTGTTGTTAGACGAcgggacCGcccAGGCAGGT
CCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGcAGaTCTCAATCGCCGCGTGCAGAAAGATCTCAA
TCTCggGaaTcTCAATGTTAGATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTaCATGTCCCAC
TgTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGgTGGCTTTGGGGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTG
GAGTACTGTGGAGTTACTCTCgTTTTTGCCCTTCTGACTTCTTTCCTTCCGTCaGaGATCTcCTaGAc
ACcGCCTCAGCTCTgTATCGgGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGCTCACCTCACCATACtGCACT
CAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGAaTTgATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAAATTTGgAAG
ATCCAGCATCcAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAACATGGGttTAAAgATcAGgCAAcTA
TTGTGGTTTTCATATaTCTTGCCTTACTTTTTGGAAGAGAgACTGTaCTTGAaTATTTGGTCTCTTTcGG
AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCCTATAGACCACCAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAA
CTACTGTTGTTAGACGACGgGACCGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGc
AGATCTCAATCGCCGCGTGCAGAAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGATGGAGAACATCAC
ATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAA
TACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGgaTcACCCGTGTGTCTTGGC
CAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCTTCCAATTTGTCCTGGTTATCG
CTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTTATCATATTCCTCTTCACTCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTATTGG
TTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCGTTTTGTCTCTAATTCCAGGATCaACAACAACCAGtACG
GGACCaTGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAA
ACCTACGgAtGGAAATTCACCTGTATCCCATCCCATCgTcTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGG
AGTGGGCCTCAGTCCGTTTTCTcTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTcAGTGGTTCGTAGGGCTT
TCCCCACTGTTTGGCTTTCAGcTATaTGGATGATGTGGTAtTGGGGCCAAGTCTGTACAgCATCgT
GAGtCCCTTTATAACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTcTGGGTATACATTTAA
    
```

Tableau 2 : liste des amorces et sondes utilisées dans les expériences de la présente invention

Sens	Séquence nucléotidique (5'-3')	SEQ ID
F	TCTTTCGGAGTGTGGATTTCG	SEQ ID NO 2
	TATGGGAGTGGGCCTCAG	SEQ ID NO 3
	AGGCAGGTCCCCTAGAAGAA	SEQ ID NO 4
	GATTCCTAGGACCCCTGCTC	SEQ ID NO 5
	GGATTTCGCACTCCTCCAGC	SEQ ID NO 6
	CCTCCAATCACTCACCAACC	SEQ ID NO 7
	TGCAACTTTTTACCTCTGC	SEQ ID NO 8
R	CCGGAAGTGTGATAAGATAGGG	SEQ ID NO 9
	GAAAGCCCTACGAACCACTG	SEQ ID NO 10
	TTGAGATCTTCTGCGACGCG	SEQ ID NO 11
	TTGAGATCTTCTGCGACGCG	SEQ ID NO 12
	ATTGAGATCTTCTGCGACGC	SEQ ID NO 13
	TTAGAGGACAAACGGGCAAC	SEQ ID NO 14
	TCAGAAGGCACAAAACGAGAG	SEQ ID NO 15
P	ACTCCTCCAGCCTATAGACCACCAA	SEQ ID NO 16
	CGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCC	SEQ ID NO 17
	ACTCCCTCGCCTCGCAGACG	SEQ ID NO 18
	GTTACAGGCGGGGTTTTTCT	SEQ ID NO 19
	AAGAAGAACTCCCTCGCCTC	SEQ ID NO 20
	TCCTGTCCTCCAATTTGTCC	SEQ ID NO 21
	ATGTCCCACTgTTCAAGCCT	SEQ ID NO 22
F	CCAGGTGACTCTGACATCATT	SEQ ID NO 23
	CTCCCACCTTTTCTCATCCAAG	SEQ ID NO 24
R	CAGGTTTAAGGTTTGCAGGT	SEQ ID NO 25
	ACATCACCCCTCTACCTCC	SEQ ID NO 26
P	TTCACCAGTCTGTTCTGGCATGC	SEQ ID NO 27
	AAAGCCAGTCCCCAGAACCCC	SEQ ID NO 28

F= amorce forward

R= amorce reverse

P= sonde

Revendications modifiées :

1. Procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du virus de l'hépatite B (VHB) dans un échantillon de patient en utilisant une combinaison de sondes et amorces entre le gène cible du virus du VHB et un IPC par les méthodes de PCR ou de qPCR **caractérisé par** l'utilisation d'un contrôle interne (IPC) innovant correspondant à des séquences de gène RPL30, au lieu des fragment d'ADN ou d'ARN, lesdites séquences sont choisies parmi :

- une amorce « forward IPC » ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO23 à SEQ ID NO24 et une des amorces « reverse IPC » ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO25 à SEQ ID NO26
- une sonde « probe IPC » permettant la détection de l'IPC dans un échantillon biologique ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO27 à SEQ ID NO28

le choix de telles séquences permet :

- la détection, en plus de la séquence virale, des séquences du gène RPL30 qui sont naturellement présents dans le sang des patients, et par la suite permet de réduire la quantité des consommables utilisés et gagner du temps en réduisant le nombre des étapes nécessaire à la réalisation du test.
 - la détection, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, de toutes les variantes virales du VHB, étant donné que les sondes et amorces de la présente invention sont conçues de telle manière à détecter tous les génotypes décrits jusqu'à présent, ce qui permettra un gain supplémentaire en spécificité
2. Procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du virus de l'hépatite B (VHB) dans un échantillon de patient selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'ensemble des amorces qui amplifient les transcrits de la région cible C, preC et S, du VHB dans un échantillon biologique incluent :
- une amorce « forward cible » ayant une séquence parmi les séquences : SEQ ID NO02 à SEQ ID NO08 et une amorce « reverse cible » ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO09 à SEQ ID NO15

- une sonde « probe cible » permettant la détection de la région cible dans un échantillon biologique ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO16 à SEQ ID NO22

3. Procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du virus de l'hépatite B (VHB) dans un échantillon de patient selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** une sonde contient une unité fluorescente (reporter) attachée à la région 5' d'ADN, en plus d'une partie quencher à la région 3' d'ADN, la quantification de l'unité fluorescence permet la quantification des gènes cibles.
4. Procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du virus de l'hépatite B (VHB) dans un échantillon de patient selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** l'amplification des transcrits de la région cible et du contrôle interne IPC de la présente invention peuvent se faire en format simplexe ou multiplexe.

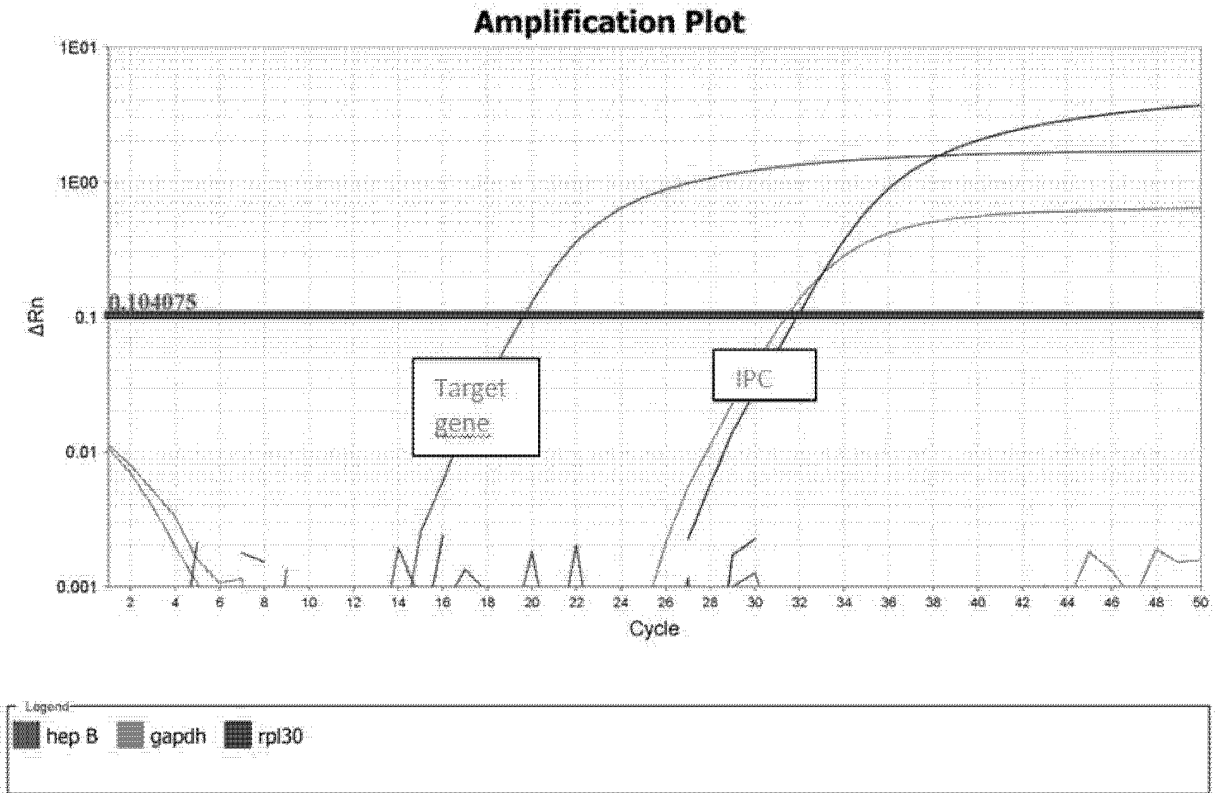


Fig. 1

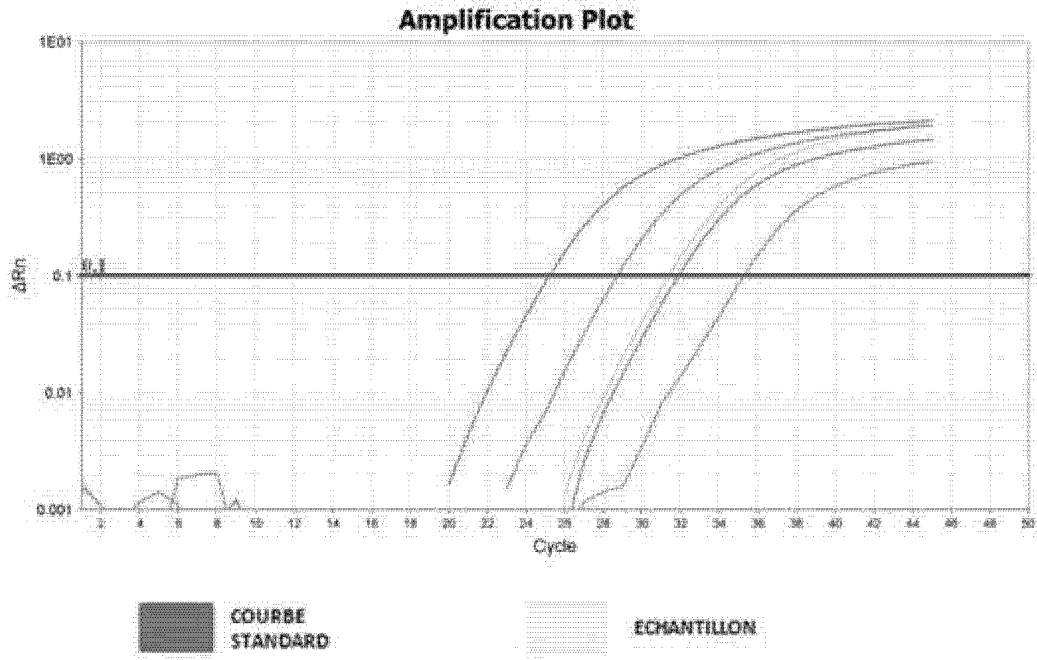


Fig. 2

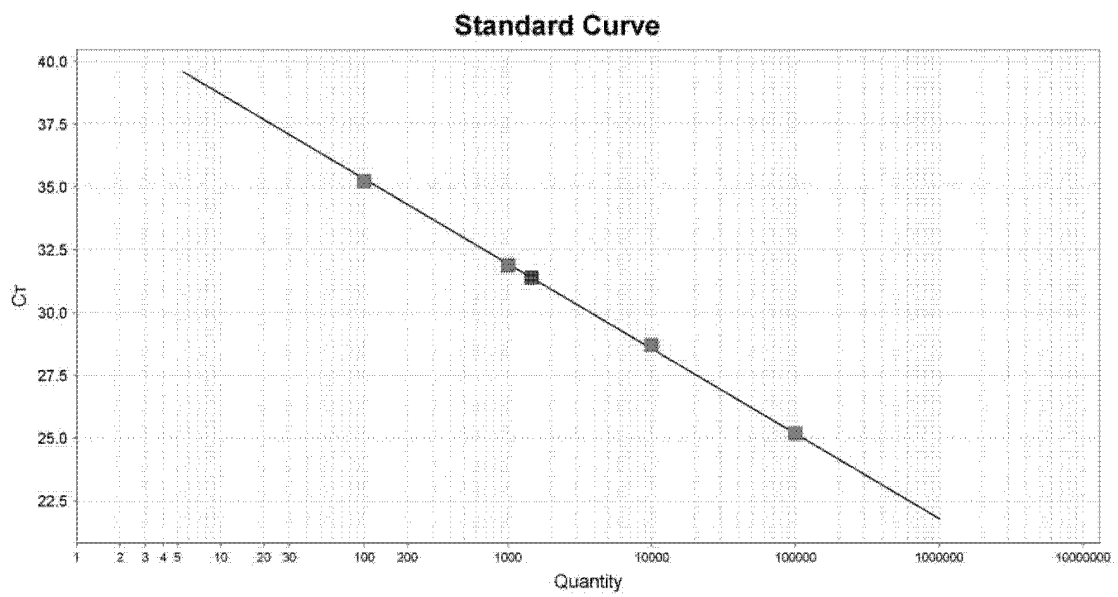


Fig. 3

**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 : 47829	Date de dépôt : 27/12/2019
Déposant : Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR)	
Intitulé de l'invention : Kit pour le diagnostic moléculaire de la charge virale du virus de l'hépatite B.	
Classement de l'objet de la demande :	
CIB : C12Q1/68, C12Q1/70 CPC : C12Q1/6851, C12Q1/6806	
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 type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur : Fatima Zahra LAHCHIMI	Date d'établissement du rapport : 02/03/2022
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
4
- 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 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants :

D1 : WO2015/137897
 D2 : WO2019/067679
 D3 : CN106801110
 D4 : WO2013033019

1. Nouveauté

Aucun des documents de l'art antérieur cité ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendication 1-4 de la présente invention. Par conséquent, l'objet desdites revendications 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

Le document D2 est considéré comme l'état de l'art le plus proche de l'objet des revendications

1-4 de la présente invention. Il divulgue un procédé pour amplifier et détecter le virus de l'hépatite B (HBV) dans un échantillon.

L'objet des revendications 1-4 diffère du document D1 par l'ensemble des amorces utilisées.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre est donc considéré comme la fourniture d'un système alternatif pour l'amplification et la détection du virus de l'hépatite B.

En se basant sur les observations présentées par le déposant, il a été clairement démontré que le choix des amorces revendiquées présente un effet technique surprenant par rapport à celles de l'état de l'art, étant donné que ces dernières couvrent l'ensemble des variant virales du VBH.

Ainsi, la solution proposée dans la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive et par la suite l'objet des revendications 1-4 est considéré comme impliquant 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. Application industrielle

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.