

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 03/09/2024

(21) Numéro de demande : BE2023/5056

(22) Date de dépôt : 30/01/2023

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12Q 1/6806, C12Q 1/6886

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

GRAND HOPITAL DE CHARLEROI
SA
6060, CHARLEROI
Belgique

(72) Inventeur(s) :

CARRASCO Javier
6000 CHARLEROI
Belgique**(54) PROCEDE POUR L'INTEGRATION CIBLÉE D'IDENTIFICATEURS MOLECULAIRES
UNIQUES (IUM) ET LA DÉTECTION DE HAUTE PRÉCISION D'ÉTATS MÉDICAUX OU
COSMETIQUES**

(57) Une méthode et un système de haute précision pour la détection d'une condition médicale ou cosmétique. Un identificateur moléculaire unique (UMI) est attaché à une séquence d'ADN ciblée comprenant une région d'intérêt (ROI) de manière ciblée. Un enrichissement de la bibliothèque NGS à l'aide de 2 amplifications PCR emboîtées d'enrichissement spécifique à la ROI est effectué, suivi d'un séquençage NGS. La précision de la détection et de la caractérisation de la diversité des récepteurs des cellules T (TCR) est considérablement accrue. Ceci est particulièrement pertinent pour les applications de surveillance des TCR telles que le cancer.

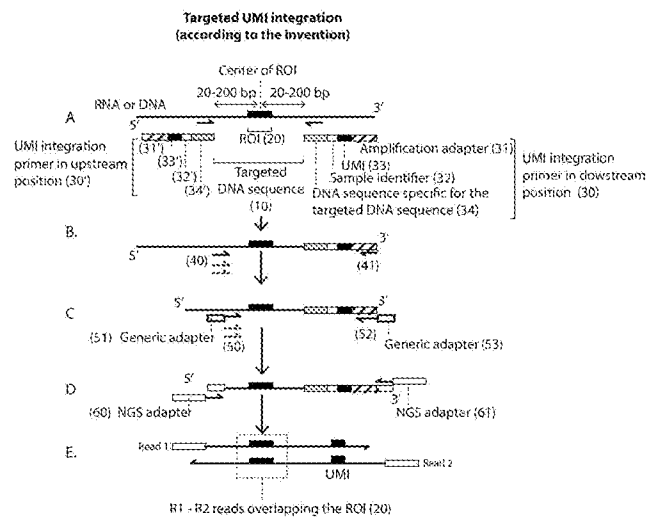


Figure 1

PROCÉDE POUR L'INTEGRATION CIBLÉE D'IDENTIFICATEURS MOLECULAIRES
UNIQVES (UMI) ET LA DÉTECTION DE HAUTE PRÉCISION D'ÉTATS MÉDICAUX
OU COSMÉTIQUES

5

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine de la détection de haute précision d'états médicaux ou cosmétiques, en particulier la détection du cancer.

CONTEXTE

10 Le cancer est une maladie multigénique complexe. Diverses altérations génétiques caractérisent cette affection. Les diagnostics de haute précision permettent de détecter l'apparition, la progression ou la récurrence d'un cancer. Cela facilite une approche plus personnalisée des soins cliniques par la stratification du risque et la sélection du traitement.

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet de déterminer des signatures d'expression génique uniques pour chaque tumeur. Cette signature contribue à la fois à la classification de la maladie, au diagnostic et au pronostic.

Par exemple, [US2022195493A1](#) à Collecta décrit la PCR ciblée multiplex par la préparation de fragments d'ADN spécifiques de gènes à code-barres. La méthode comprend l'utilisation d'un ensemble de paires d'amorces spécifiques de gènes, dans laquelle chaque paire d'amorces spécifiques de gènes est constituée d'une amorce directe et d'une amorce inverse, dont au moins une comprend un domaine de code-barres d'échantillon. L'acide nucléique codé à barres de l'échantillon a la structure suivante : 3-linker 1-domaine de code-barres de l'échantillon-domaine d'ancrage 2-domaine de liaison à l'ARN-5. Cependant, ce document ne décrit pas une méthode comprenant l'intégration d'une amorce d'intégration UMI, suivie de deux amplifications PCR d'enrichissement emboîtées consécutives.

[US2021355533A1](#) à Tempus Labs divulgue le profilage du répertoire des récepteurs des cellules T (TCR) et des récepteurs des cellules B (BCR) en utilisant des méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) et des sondes de capture hybrides. Les sondes de capture hybrides comprennent, dans l'ordre de 5' à 3', une région

30

d'amplification, une région d'étiquette d'échantillon, une UMI et une région d'ancrage. Par conséquent, il existe toujours un besoin d'améliorer encore le diagnostic du cancer.

COURTE DESCRIPTION DE L'INVENTION

Les inventeurs ont découvert de manière surprenante que la précision de la détection et de la caractérisation de la diversité des récepteurs des cellules T (TCR) est

5 de la caractérisation de la diversité des récepteurs des cellules T (TCR) est considérablement accrue par les moyens suivants

- * intégrer l'UMI en amont ou en aval d'une région d'intérêt (ROI) et
- * réalisation d'un enrichissement de la bibliothèque NGS à l'aide de 2 amplifications PCR nichées spécifiques aux ROI.

10 Ceci est particulièrement pertinent pour les applications de surveillance du TCR, comme le cancer.

En conséquence, un premier aspect de l'invention est Une méthode de haute précision pour la détection d'une condition médicale ou cosmétique, comprenant :

A. Fournir un échantillon de patient comprenant une séquence d'ADN ciblée (10)

15 ; dans lequel la séquence d'ADN ciblée est de 20 à 200 bases en amont et de 20 à 200 paires de bases en aval du centre d'une région d'intérêt (ROI, 20), dans lequel la ROI (20) consiste en 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférentiellement de 20 à 50 bases ; et dans laquelle la ROI (20) est associée à l'état médical ou cosmétique ; et la fixation d'un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33') à la séquence d'ADN ciblée (10) en utilisant

20 une amorce d'intégration UMI (30, 30') ; dans laquelle l'amorce d'intégration UMI (30, 30') comprend :

- * un adaptateur d'amplification (31, 31'),
- * un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33'),
- 25 * un identifiant d'échantillon (32, 32') ; et
- * une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'), dans laquelle l'extrémité 3' est voisine de la séquence d'ADN ciblée (10).

B. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une première PCR d'enrichissement, obtenant ainsi un premier amplicon d'enrichissement de 200

30 à 700 paires de bases, dans lequel le premier amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;

- C. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une seconde PCR d'enrichissement emboîtée, obtenant ainsi un second amplicon d'enrichissement de 200 à 500 paires de bases, dans lequel le second amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;
- 5 D. Fixer des adaptateurs NGS (60, 61) aux seconds amplicons PCR d'enrichissement ; et
- E. Séquençage des amplicons du second enrichissement par séquençage de nouvelle génération (NGS) ;
- dans laquelle la première PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec
- 10 :
- * une ou plusieurs premières amorces PCR d'enrichissement (40), dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont spécifiques de la séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont en sens direct si l'amorce d'intégration UMI (30) est en aval du ROI (20) ; et dans lesquelles
 - 15 les premières amorces PCR d'enrichissement sont en sens inverse si l'amorce d'intégration UMI (30') est en amont du ROI (20) ; et
 - * une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) ;
- dans lequel la seconde PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :
- 20 * une ou plusieurs secondes amorces PCR d'enrichissement (50), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont spécifiques pour le ROI (20) ou pour les séquences d'ADN ciblées (10), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont imbriquées par rapport aux premières amorces PCR d'enrichissement (40)
 - 25 ; et dans lesquelles la seconde amorce PCR d'enrichissement (50) comprend un adaptateur générique (51) à l'extrémité 5' ; et
 - * une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31), dans laquelle l'amorce (52) comprend un adaptateur générique (53).

Dans un autre aspect, la séquence d'ADN ciblée (10) a une longueur de 20 à 200
30 nucléotides, de préférence de 20 à 100 nucléotides à partir du centre du ROI.

Dans un autre aspect, le ROI (20) est constitué de 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférablement de 20 à 50 bases.

Dans un autre aspect, la séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34') a une longueur de 10 à 60 nucléotides, de préférence de 15 à 25 nucléotides, et encore plus préférablement de 18 à 24 nucléotides.

5 Dans un autre aspect, l'UMI a une longueur de 5 à 20 nucléotides, de préférence de 8 à 18 nucléotides, encore plus préférablement de 12 à 15, et encore plus préférablement de 14 nucléotides.

Dans un autre aspect, l'UMI est une séquence aléatoire, une séquence semi-aléatoire ou une combinaison de celles-ci.

10 Dans un autre aspect, la partie aléatoire de la séquence semi-aléatoire est de 2 à 12 bases.

Dans un autre aspect, l'UFM se compose de l'ordre de base consécutif suivant :

- 4 bases aléatoires,
- une base fixe,
- 4 bases aléatoires,
- 15 ▪ une base fixe, et
- 4 bases aléatoires.

Dans un autre aspect, la région d'intérêt est un récepteur de cellules T ou un récepteur de cellules B, de préférence un récepteur de cellules T.

20 Dans un autre aspect, la condition médicale est le cancer, de préférence le cancer du sein ou le cancer gastro-intestinal.

Dans un autre aspect, la condition médicale est un cancer récidiviste.

Dans un autre aspect, le procédé comprend la détermination d'un traitement en fonction de la région d'intérêt détectée.

25 Un autre aspect est un système pour la détection de haute précision d'une condition médicale ou cosmétique, comprenant des moyens configurés pour réaliser les étapes suivantes :

- A. Fournir un échantillon de patient comprenant une séquence d'ADN ciblée (10)
; dans lequel la séquence d'ADN ciblée est de 20 à 200 bases en amont et de
20 à 200 paires de bases en aval du centre d'une région d'intérêt (ROI, 20),
30 dans lequel la ROI (20) est constituée de 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et

encore plus préférentiellement de 20 à 50 bases ; et dans laquelle la ROI (20) est associée à l'état médical ou cosmétique ; et la fixation d'un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33') à la séquence d'ADN ciblée (10) en utilisant une amorce d'intégration UMI (30, 30') ; dans laquelle l'amorce d'intégration UMI (30, 30') comprend :

5

- un adaptateur d'amplification (31, 31'),
- un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33'),
- un identifiant d'échantillon (32, 32') ; et
- une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'), dans laquelle l'extrémité 3' est voisine de la séquence d'ADN ciblée (10).

10

B. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une première PCR d'enrichissement, obtenant ainsi un premier amplicon d'enrichissement de 200 à 700 paires de bases, dans lequel le premier amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;

15

C. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une seconde PCR d'enrichissement emboîtée, obtenant ainsi un second amplicon d'enrichissement de 200 à 500 paires de bases, dans lequel le second amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;

20

D. Fixer des adaptateurs NGS (60, 61) aux seconds amplicons PCR d'enrichissement ; et

E. Séquençage des amplicons du second enrichissement par séquençage de nouvelle génération (NGS) ;

dans laquelle la première PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :

25

- une ou plusieurs premières amorces PCR d'enrichissement (40), dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont spécifiques de la séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont en sens direct si l'amorce d'intégration UMI (30) est en aval du ROI (20) ; et dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement sont en sens inverse si l'amorce d'intégration UMI (30') est en amont du ROI (20) ; et

30

- une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) ;

dans lequel la seconde PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :

- 5 ▪ une ou plusieurs secondes amorces PCR d'enrichissement (50), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont spécifiques pour le ROI (20) ou pour les séquences d'ADN ciblées (10), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont imbriquées par rapport aux premières amorces PCR d'enrichissement (40) ; et dans lesquelles la seconde amorce PCR d'enrichissement (50) comprend un adaptateur générique (51) à l'extrémité 5' ; et
- 10 ▪ une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31), dans laquelle l'amorce (52) comprend un adaptateur générique (53).

L'invention va maintenant être décrite plus en détail :

TCR

15 Le terme "TCR" ou "récepteur des cellules T" désigne un complexe protéique présent à la surface des cellules T, ou lymphocytes T, qui est responsable de la reconnaissance de fragments d'antigènes sous forme de peptides liés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Dans certains modes de réalisation, le terme TCR ou récepteur de cellules T se réfère à au moins une partie de la région d'un génome responsable du développement du récepteur de cellules T.

20 La diversité des TCR est obtenue par le processus de recombinaison. Lors de la présentation de l'antigène par les cellules de l'immunité innée, les lymphocytes qui portent des récepteurs à haute affinité pour l'antigène sont activés et se développent de manière clonale. Les lymphocytes activés se différencient pour devenir des cellules effectrices. Après une infection, les cellules mémoire peuvent persister pendant toute la vie de l'hôte.

25 La variété des récepteurs lymphocytaires d'un sujet est généralement appelée le "répertoire". Par conséquent, le répertoire des récepteurs lymphocytaires représente une empreinte digitale de la réponse à des maladies telles que le cancer. Cette empreinte digitale fournit un enregistrement des défis immunologiques passés. Pour les cancers du sang, le répertoire peut être surveillé pour la "tumeur" ou les cellules cancéreuses. Pour
30 les cancers solides, le répertoire peut être utilisé pour étudier les raisons pour lesquelles le système immunitaire ne reconnaît pas/élimine les cellules cancéreuses comme des

cellules non-soi. Pour ces raisons au moins, le profil des récepteurs lymphocytaires d'un sujet individuel suscite un grand intérêt.

BCR

5 "BCR" ou "récepteur de cellule B" fait référence aux molécules d'immunoglobuline qui forment une protéine réceptrice habituellement située sur la surface externe d'un type de lymphocyte appelé "cellule B". Dans certains modes de réalisation, le terme BCR ou récepteur de cellules B fait référence à au moins une partie de la région d'un génome responsable du développement du récepteur de cellules B.

Répertoire TCR/BCR

10 "Répertoire TCR/BCR" désigne la totalité des informations dérivées du séquençage des acides nucléiques d'un échantillon isolé d'un sujet/patient à l'aide de la méthode de la présente invention. Un répertoire TCR/BCR comprend des informations, par exemple sous forme de données de séquence, sur des gènes cibles. Ces informations peuvent être analysées par des méthodes connues dans l'art pour déterminer les types de
15 récepteurs.

V(D)J

La "recombinaison V(D)J" désigne le réarrangement quasi aléatoire des segments de gènes variables (V), de jonction (J) et de diversité (D). Il en résulte une variété de séquences d'acides aminés dans les régions de liaison aux antigènes des
20 immunoglobulines et des TCR qui permettent la reconnaissance des antigènes des agents pathogènes ainsi que des cellules cancéreuses.

La "région V" désigne un segment de gène variable de BCR ou de TCR ou un produit génique de celui-ci.

25 "Région D" désigne un segment de gène de diversité BCR ou TCR ou un produit génique de celui-ci.

"Région J" désigne un segment de gène de jonction BCR ou TCR ou un produit génique de celui-ci.

La "région C" désigne un segment de gène constant BCR ou TCR ou un produit génique de celui-ci.

Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Le profilage immunitaire s'appuie sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) pour séquencer avec précision le répertoire des récepteurs immunitaires. Le NGS peut produire des "lectures" de séquençage. Ces lectures sont ensuite alignées sur un génome ou un transcriptome de référence pour donner une image relativement complète d'un génome ou du transcriptome d'un échantillon.

Le NGS a généralement un taux d'erreur d'environ 0,5 à 0,2 %. Cela signifie que de 1/200 à 1/500 bases sont incorrectes. Les stratégies d'annotation moléculaire sont utilisées pour détecter les variants et autres mutations qui se produisent à des fréquences plus faibles.

L'assemblage et l'analyse des lectures des récepteurs des lymphocytes T et B restent un défi. Des données de séquençage de haute qualité dépendent de la largeur et de la profondeur du séquençage. La largeur fait référence au nombre de bases du génome qui sont couvertes par le séquençage. La profondeur fait référence au nombre de fois qu'une base ou une région particulière est couverte par le cycle de séquençage.

Cependant, la présence de transcrits codant pour des récepteurs lymphocytaires peut être très limitée. Par conséquent, il peut être difficile d'obtenir des résultats de séquençage profond qui représentent avec précision le répertoire des cellules T et B d'un sujet individuel, sans enrichir ou sélectionner directement les régions non constantes des TCR et des BCR.

"Read" fait référence à une séquence d'ADN d'au moins 30 bases. Les lectures peuvent être utilisées pour identifier une séquence ou une région plus importante en l'alignant sur un chromosome, une région génomique ou un gène. Une lecture peut être une lecture paires ou simple.

"Aligné", "alignement" ou "alignement" font référence à un processus utilisé pour identifier les régions de similarité. L'alignement consiste à faire correspondre des séquences avec des positions dans un génome de référence en se basant sur l'ordre de leurs nucléotides dans ces séquences. L'alignement peut être effectué manuellement ou par un algorithme informatique. Un algorithme préféré est l'application ELAND (Efficient Local Alignment of Nucleotide Data) distribuée par Illumina. L'alignement peut faire référence à une correspondance de séquence de 100 % ou à une correspondance inférieure à 100 % (correspondance non parfaite). L'alignement peut inclure un pseudo-alignement.

Bibliothèque

Les termes "bibliothèque" et "bibliothèque de séquençage" désignent un ensemble de fragments d'ADN auxquels sont fixés des adaptateurs.

Adaptateur NGS

- 5 Les "adaptateurs NGS" sont généralement conçus pour interagir avec une plateforme de séquençage spécifique, par exemple la surface d'une cellule à flux (Illumina) ou des billes (Ion Torrent), afin de faciliter une réaction de séquençage.

Variante

- 10 "Variant" signifie une différence dans une séquence génétique ou un profil génétique, par rapport à un génome de référence ou un profil génétique de référence.

Niveau d'expression

- 15 "Niveau d'expression" est utilisé ici pour décrire le nombre de copies d'une molécule particulière d'ARN ou de protéine générée par un gène ou une autre région de régulation génétique. Le niveau d'expression peut être normalisé à l'aide de méthodes standard. Ces méthodes comprennent le comptage par million ou la détermination du logarithme de base 10 du nombre de lectures brutes. Cette région peut être définie par un emplacement chromosomique ou un autre indicateur de cartographie génétique.

Séquence d'ADN ciblée et région d'intérêt (ROI)

- 20 Dans un mode de réalisation, la "séquence d'ADN ciblée" peut être n'importe quel gène partiel ou complet pertinent dans le développement, la détection ou la prévention de conditions, maladies ou troubles médicaux ou cosmétiques. Dans un mode de réalisation, le gène cible est un gène du cancer ou un gène impliqué dans l'immunologie.

La "séquence d'ADN ciblée" est caractéristique de la région d'intérêt (ROI), de préférence d'une région conservée de la ROI.

- 25 Dans un mode de réalisation préféré, la séquence d'ADN ciblée a une longueur de 20 à 200 bases à partir du centre du ROI, de préférence de 20 à 100 bases à partir du centre du ROI.

La séquence d'ADN ciblée comprend la "région d'intérêt".

- 30 La "région d'intérêt" est généralement une variante du gène cible ou une partie du gène cible. Les termes "région d'intérêt" et "région ciblée" sont utilisés de manière interchangeable.

Dans un mode de réalisation, le ROI (20) est constitué de 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférentiellement de 20 à 50 bases.

Dans un autre mode de réalisation, le ROI (20) est constitué uniquement de 1 à 5 bases, comme par exemple 1 base.

- 5 Dans un mode de réalisation, le ROI (20) est associé à l'état médical ou cosmétique ;

Distance du ROI

La distance par rapport à la ROI est calculée comme la distance par rapport au centre de la ROI, comme indiqué sur la figure 1. Si le ROI est un nucléotide unique, la distance du ROI est calculée à partir de ce nucléotide. Dans le cas d'un nombre pair de bases du ROI, 10 la distance est calculée à partir de la moitié de la longueur du ROI. Pour un ROI de 20 bases, la distance à la base 10 dans le sens de la lecture. Pour un ROI de 21 bases, la distance est calculée à partir de la base 10 dans le sens de la lecture. Pour un ROI de 22 bases, la distance est calculée à partir de la base 11 dans le sens de la lecture. Pour un ROI de 23 bases, la distance est calculée à partir de la base 12 dans le sens de la lecture.

- 15 **Séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée**

Dans un mode de réalisation, la séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée a une longueur de 10 à 60 nucléotides, de préférence de 15 à 25 nucléotides, et encore plus préférentiellement de 18 à 24 nucléotides.

Bases et nucléotides

- 20 Les termes "bases" et "nucléotides" sont utilisés de manière interchangeable dans le contexte de la présente invention.

Apprêt

Une "amorce" est un acide nucléique court et simple brin qui initie la synthèse et la réplication de l'ADN par une ADN polymérase.

- 25 Les amorces de la présente invention sont de préférence des oligonucléotides synthétisés chimiquement, de préférence des oligonucléotides d'ADN. Une longueur typique de l'amorce est de 10 à 30 nucléotides, de préférence de 15 à 25 nucléotides, de préférence entre 18 et 24 nucléotides.

En amont

- 30 "En amont" signifie en général vers l'extrémité 5' du brin codant pour la séquence d'ADN ciblée.

En aval

"En aval" signifie vers l'extrémité 3' du brin codant pour la séquence d'ADN ciblée.

Intégration ciblée des IUFM

L'"intégration de l'UMI" selon la présente invention est ciblée. L'intégration ciblée de l'UMI est réalisée grâce à une amorce d'intégration d'UMI (30, 30'). L'amorce d'intégration UMI (30, 30') est conçue de manière à permettre l'intégration de l'UMI en amont ou en aval à une distance allant de 20 à 200 paires de bases du centre du ROI (20). L'amorce d'intégration d'UMI (30, 30') comprend typiquement et de préférence se compose de :

- un adaptateur d'amplification (31, 31'),
- 10 ▪ un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33'),
- un identifiant d'échantillon (32, 32') ; et
- une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'), dans laquelle l'extrémité 3' est voisine de la séquence d'ADN ciblée (10).

Dans un mode de réalisation, l'UMI a une longueur de 5 à 20 nucléotides, de préférence de 8 à 18 nucléotides, encore plus préférentiellement de 12 à 15, et encore plus préférentiellement de 14 nucléotides.

Dans un mode de réalisation, l'UMI est une séquence aléatoire, une séquence semi-aléatoire ou une combinaison de celles-ci.

Dans un mode de réalisation, la partie aléatoire de la séquence semi-aléatoire est de 2 à 12 bases.

Dans un mode de réalisation, l'UMI se compose de l'ordre de base consécutif suivant :

- 4 bases aléatoires,
- une base fixe,
- 4 bases aléatoires,
- 25 ▪ une base fixe, et
- 4 bases aléatoires.

Dans un mode de réalisation, l'amorce est conçue pour correspondre à une région conservée généralement en amont de la région ciblée du gène cible ou de la région d'intérêt.

30 Dans un autre mode de réalisation, l'amorce d'intégration UMI est une amorce dégénérée.

Dans un mode de réalisation préféré, l'UMI est intégrée à l'extrémité 3' de la séquence d'ADN ou d'ARN.

À partir de l'ARN, l'UMI est généralement intégré par une transcriptase inverse.

Enrichissement par PCR

5 La PCR peut être réalisée en utilisant toutes les conditions de réaction PCR standard.

L'"enrichissement" est de préférence spécifique à la séquence par le biais d'amorces PCR spécifiques à la cible. Cependant, l'enrichissement non spécifique impliquant n'importe lequel des acides nucléiques présents dans un échantillon peut également être inclus.

10 "Enrichi" fait référence au niveau ou à une quantité d'une ou plusieurs biomolécules dans un échantillon. "Enrichi" peut également faire référence à un niveau ou une quantité accrue de la ou des biomolécules par rapport à un niveau de contrôle. "Enrichi" peut également faire référence à l'abondance relative par rapport aux autres biomolécules de l'échantillon (quantité relative). Dans un contexte de science des données, "enrichissement" fait référence à un enrichissement statistique.

15 Dans un mode de réalisation préféré, deux enrichissements PCR ou plus sont effectués :

- un premier enrichissement par PCR ; et
- un second enrichissement par PCR nichée.

Première PCR d'enrichissement

20 La première PCR d'enrichissement comprend l'amplification de la séquence d'ADN ciblée (10) pour obtenir un premier amplicon d'enrichissement de 200 à 700 paires de bases, dans lequel le premier amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20). La première PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :

- 25 ▪ une ou plusieurs premières amorces PCR d'enrichissement (40), dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont spécifiques de la séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont en sens direct si l'amorce d'intégration UMI (30) est en aval du ROI (20) ; et dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement sont en sens inverse si l'amorce d'intégration UMI (30') est en amont du ROI (20) ; et
- 30 ▪ une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) ;

Deuxième PCR d'enrichissement nichée

La seconde PCR d'enrichissement comprend l'amplification de la séquence d'ADN ciblée (10) pour obtenir un second amplicon d'enrichissement de 200 à 500 paires de bases, dans lequel le second amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20).

- 5 La seconde PCR d'enrichissement comprend une amplification avec :
- une ou plusieurs secondes amorces PCR d'enrichissement (50), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont spécifiques du ROI (20) ou de la séquence d'ADN ciblée (10), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont imbriquées par rapport aux premières amorces PCR d'enrichissement (40) ; et dans lesquelles la seconde amorce PCR d'enrichissement (50) comprend un adaptateur générique (51) à l'extrémité 5' ; et
 - 10 ▪ une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31), dans laquelle l'amorce (52) comprend un adaptateur générique (53).

15 Grâce à cette deuxième amplification PCR nichée, la précision peut être considérablement accrue.

Utilisation pour détecter un problème médical ou cosmétique

La méthode de la présente invention est utile pour détecter un état médical ou cosmétique. La méthode de la présente invention est utile en tant que biomarqueur.

Biomarqueur

20 Dans un mode de réalisation, la méthode de la présente invention est utilisée comme biomarqueur ou comme diagnostic complémentaire.

"Biomarqueur" : toute variante génétique ou molécule ou ensemble de molécules, ou caractéristique d'une molécule. Il peut inclure la localisation ou le niveau d'expression. Le biomarqueur est indicatif ou corrélié avec une condition d'intérêt comme suit :

- 25
- l'existence d'une infection,
 - un état pathologique ou une maladie, comme le cancer,
 - la susceptibilité à une infection, à une affection ou à une maladie chez le sujet,
 - la probabilité que l'infection, l'état pathologique ou la maladie soit d'un sous-type ou d'un autre,
 - 30 ▪ la probabilité qu'un patient réponde ou non à une thérapie particulière ou à une classe de thérapie,

- le degré de la réponse positive que l'on pourrait attendre d'une thérapie ou d'une classe de thérapies (par exemple, la survie et/ou la survie sans progression, qui peut être quantifiée comme un intervalle de temps),
- la réponse d'un patient à un traitement, ou la probabilité qu'une infection, un état pathologique ou une maladie ait progressé ou progresse, ou ait ou progresse au-delà de son site d'origine (c'est-à-dire qu'il y ait des métastases),

Dans un mode de réalisation préféré, la méthode de la présente invention est utilisée pour déterminer le risque de récurrence d'un patient atteint de cancer.

Le biomarqueur comprend de préférence un répertoire ou un profil TCR/BCR.

- 10 L'état médical ou cosmétique peut être n'importe quel état. De préférence, l'état médical est le cancer.

Cancer

- 15 Le terme "cancer" désigne les tumeurs bénignes ou malignes. Les tumeurs peuvent être capables de se développer de manière invasive et de former des métastases dans le corps humain ou animal ou dans une partie de celui-ci. Les tumeurs peuvent former des métastases via le système lymphatique et/ou la circulation sanguine. Les tumeurs comprennent également les tumeurs solides. Les cancers typiques comprennent les carcinomes, les lymphomes ou les sarcomes. Les exemples sont le cancer de la peau, le cancer des ovaires, le cancer du côlon, le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer du poumon, le cancer de la prostate, le cancer des voies urinaires, le cancer de l'utérus, la leucémie lymphatique aiguë, la maladie de Hodgkin, le carcinome à petites cellules du poumon, le mélanome, le neuroblastome, le gliome et le sarcome des tissus mous de l'homme.

- 25 Des exemples de cancers qui peuvent être détectés, identifiés, prédits, diagnostiqués ou surveillés avec la méthode de la présente invention incluent le cancer de la peau, le cancer des cellules B, par ex, le myélome multiple, les mélanomes, le cancer du sein, le cancer du poumon (tel que le carcinome pulmonaire non à petites cellules ou NSCLC), le cancer des bronches, le cancer colorectal, le cancer de la prostate, le cancer du pancréas, le cancer de l'estomac, le cancer des ovaires, le cancer de la vessie, le cancer du cerveau
30 ou du système nerveux central, cancer du système nerveux périphérique, cancer de l'œsophage, cancer du col de l'utérus, cancer de l'utérus ou de l'endomètre, cancer de la cavité buccale ou du pharynx, cancer du foie, cancer du rein, cancer du testicule, cancer

des voies biliaires, cancer de l'intestin grêle ou de l'appendice, cancer des glandes salivaires, cancer de la thyroïde, cancer des glandes surrénales, ostéosarcome, chondrosarcome, cancer des tissus hématologiques, adénocarcinomes, tumeurs myofibroblastiques inflammatoires, tumeur stromale gastro-intestinale (GIST), cancer du

5 côlon, myélome multiple (MM), syndrome myélodysplasique (SMD), trouble myéloprolifératif (MPD), leucémie lymphocytaire aiguë (LLA), leucémie myélocytaire aiguë (LMA), leucémie myélocytaire chronique (LMC), leucémie lymphocytaire chronique (LLC), polyglobulie véra, lymphome de Hodgkin, lymphome non hodgkinien (LNH), sarcome des

10 tissus mous, fibrosarcome, myosarcome, liposarcome, sarcome ostéogénique, chordome, angiosarcome, endothéliosarcome, lymphangiosarcome, lymphangioendothéliosarcome, synoviome, mésothéliome, tumeur d'Ewing, léiomyosarcome, rhabdomyosarcome, carcinome épidermoïde, carcinome basocellulaire, adénocarcinome, carcinome des glandes sudoripares, carcinome des glandes sébacées, carcinome papillaire, adénocarcinomes papillaires, carcinome médullaire, carcinome

15 bronchogénique, carcinome des cellules rénales, hépatome, carcinome du canal biliaire, choriocarcinome, séminome, carcinome embryonnaire, tumeur de Wilms, carcinome de la vessie, carcinome épithélial, gliome, astrocytome, médulloblastome, craniopharyngiome, épendymome, pinéalome, hémangioblastome, neurinome acoustique, oligodendrogliome, méningiome, neuroblastome, rétinoblastome, lymphome

20 folliculaire, lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome à cellules du manteau, carcinome hépatocellulaire, cancer de la thyroïde, cancer gastrique, cancer de la tête et du cou, cancers à petites cellules, thrombocythémie essentielle, métaplasie myéloïde agnogène, syndrome hyperéosinophilique, mastocytose systémique, hyperéosinophilie familiale, leucémie éosinophilique chronique, cancers neuroendocriniens ou tumeurs

25 carcinoïdes.

Traitement

Dans un mode de réalisation, le procédé de la présente invention comprend en outre la détermination d'un traitement ou d'une recommandation de traitement en fonction de la région d'intérêt détectée.

30 "Traitement" ou "traiter" signifie obtenir un effet pharmacologique et/ou physiologique souhaité. L'effet peut être prophylactique. Par conséquent, dans un mode de réalisation, une maladie ou un symptôme de celle-ci sont complètement ou partiellement prévenus. Dans un autre mode de réalisation, le traitement est la guérison partielle ou complète d'une

maladie et/ou d'un effet indésirable attribuable à la maladie. Le "traitement", tel qu'il est utilisé dans le présent document, couvre tout traitement d'une maladie chez un mammifère, et comprend :

- 5 ▪ empêcher la maladie de se manifester chez un sujet qui peut être sensible à la maladie mais dont la maladie n'a pas encore été diagnostiquée ;
- (b) inhiber la maladie ou la réapparition de la maladie, c'est-à-dire arrêter son développement ; ou (c) soulager la maladie, c'est-à-dire provoquer la régression de la maladie. L'agent thérapeutique peut être administré avant, pendant ou après le début de la maladie ou de la blessure.
- 10 ▪ le traitement d'une maladie en cours, où le traitement stabilise ou réduit les symptômes cliniques indésirables du patient, présente un intérêt particulier. Il est souhaitable que le traitement en question soit administré pendant la phase symptomatique de la maladie, et dans certains cas, après la phase symptomatique de la maladie.

15 **Avantages**

Les méthodes et systèmes de la présente invention permettent la détection quantitative ou qualitative de haute précision de mutations, de délétions génétiques et de polymorphismes, ainsi que la production ou la quantification d'amplicons pour le séquençage à haut débit. Les méthodes et systèmes de haute précision de la présente invention permettent l'identification de conditions médicales ou cosmétiques avant leur détectabilité radiologique. Par conséquent, la méthode de la présente invention est particulièrement utile pour détecter le début d'un cancer ou la récurrence d'un cancer.

Chaque cellule T et chaque cellule B est unique au niveau de l'ADN. Elles diffèrent au niveau du gène du récepteur des cellules T (TCR) ou du gène du récepteur des cellules B (BCR) qui détermine l'antigène qui sera reconnu par la cellule. L'assemblage et la détermination des séquences des gènes TCR et BCR peuvent aider à prédire les réponses immunitaires, à diagnostiquer ou à confirmer des maladies, des états ou l'exposition à des agents pathogènes, à déterminer la gravité de la maladie, à mesurer ou à confirmer l'effet et l'efficacité thérapeutiques, à déterminer la maladie résiduelle minimale (MRD) et à fournir les informations nécessaires pour produire des thérapies ou des traitements spécifiques.

COURTE DESCRIPTION DES DESSINS

Figure 1

La figure 1 montre une représentation schématique du procédé de la présente invention . Dans une première étape (A), l'UMI est intégrée à l'aide de l'amorce d'intégration UMI contenant de 5' à 3', un adaptateur d'amplification (31, 31'), une UMI (33, 33'), un identifiant d'échantillon (32, 32') et une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'). Lorsque le modèle de départ est un ARN, l'amorce d'intégration UMI est positionnée en aval (30) de la région cible à une distance allant de 20 à 200 paires de bases et utilisée dans une réaction de transcription inverse. Lorsque le modèle de départ est un ADN double brin, l'amorce d'intégration UMI peut être en aval (30) de la région cible à une distance de 20-200 paires de bases mais aussi en amont (30') dans le même intervalle de distance. Dans une deuxième étape (B), une première amplification PCR est réalisée en utilisant une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) de l'amorce d'intégration UMI (30) et une ou plusieurs amorces d'amplification (40) spécifiques du ou des gènes ciblés. Ces amorces spécifiques peuvent être en position avant ou arrière selon la position de l'amorce d'intégration UMI dans la première étape. Dans une troisième étape (C), une seconde amplification PCR emboîtée est réalisée en utilisant une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) de l'amorce d'intégration UMI (30) et une ou plusieurs amorces d'amplification (50) spécifiques du ou des gènes ciblés. Ces amorces contiennent un adaptateur générique à leur extrémité 5' (51, 53). Les amplicons obtenus après cette seconde PCR emboîtée ont une taille comprise entre 200 et 500 paires de bases. La quatrième étape (D) permet l'intégration des adaptateurs NGS (60 et 61) en utilisant des amorces complémentaires aux adaptateurs génériques (51, 53) introduits lors de la troisième étape. Les amplicons obtenus sont ensuite séquencés (E) par NGS en paires pour obtenir des paires de lectures chevauchantes dans le ROI. Ce procédé peut être utilisé pour la détection d'une condition médicale ou cosmétique. Dans un autre mode de réalisation, le procédé de la présente invention peut être utilisé comme biomarqueur.

Figure 2

À titre de comparaison, la figure 2 illustre une méthode d'intégration non ciblée de l'UMI à l'extrémité 5' d'un fragment de gène, par exemple en utilisant un oligonucléotide de commutation terminal avec un UMI pendant une réaction de transcription inverse, selon l'art antérieur. Cette approche ne permettant pas de contrôler la distance entre la position

de l'UMI et un ROI, la taille des amplicons générés lors de la construction de la librairie ne peut être contrôlée et leur séquençage par NGS par paire ne garantit pas le chevauchement des paires de lecture dans le ROI. La qualité de la séquence est alors diminuée.

5 Figure 3

La figure 3 illustre l'avantage d'une intégration ciblée d'UMIs selon le procédé décrit dans l'invention (figure 1) par rapport à une intégration non ciblée telle que décrite dans l'art antérieur (figure 2) en termes de qualité des séquences obtenues par NGS ciblé. Les gènes ciblés dans les bibliothèques illustratives correspondent aux TCRs bêta et les ROIs correspondent à la région hypervariable CDR3. Une qualité de séquence très élevée est particulièrement importante pour la caractérisation de ces gènes extrêmement diversifiés. Pour chaque bibliothèque, la qualité des séquences obtenues est évaluée en mesurant le pourcentage moyen de bases avec un Phred QS < 20 (impliquant un risque d'appel de base incorrect de > 1/ 100) par paire de lectures alignées sur un TCR bêta. Les résultats obtenus pour 36 bibliothèques dans lesquelles les UMIs ont été intégrées de manière ciblée selon l'invention décrite sont présentés dans le boxplot 3A et ceux obtenus pour 18 bibliothèques dans lesquelles les UMIs ont été intégrées de manière non ciblée selon l'art antérieur, sont présentés dans le boxplot 3B.

Figure 4

La figure 4 illustre l'avantage de l'enrichissement de la (des) séquence(s) d'ADN ciblée(s) pendant la construction d'une bibliothèque NGS basée sur deux PCR imbriquées spécifiques de ce(s) gène(s) conformément à la méthode décrite dans l'invention (figure 1) par rapport à l'enrichissement basé sur une seule PCR spécifique de ce(s) gène(s). Les gènes ciblés dans les bibliothèques illustratives correspondent aux gènes bêta du TCR et les ROIs correspondent à la région hypervariable CDR3. Une efficacité d'enrichissement élevée est particulièrement importante pour la détection de réarrangements rares de TCRs bêta ou la détection de TCRs bêta dans des échantillons contenant peu de cellules T. L'efficacité de l'enrichissement est évaluée en mesurant le pourcentage de lectures appariées alignées sur les gènes TCR beta par rapport au nombre total de lectures brutes obtenues (% de lectures on-target). Les résultats obtenus pour 36 bibliothèques où l'enrichissement a utilisé 2 PCR nichées spécifiques aux gènes TCR beta selon l'invention décrite sont présentés dans le boxplot 4A et ceux obtenus pour 18 bibliothèques où

l'enrichissement a utilisé 1 seule PCR spécifique aux TCR beta selon l'art antérieur sont présentés dans le boxplot 4B.

EXEMPLES

Exemple 1

5 L'exemple 1 vise à illustrer l'avantage d'une intégration ciblée d'UMIs par rapport à une intégration non ciblée en termes de qualité du séquençage NGS.

A. Une série de bibliothèques NGS ciblées sur les gènes bêta du TCR ont été construites Intégration d'UMI

10 Pour la figure 3A, l'ARN d'un échantillon de PBMC a été extrait et engagé dans une réaction de transcription inverse en utilisant une amorce d'intégration UMI. L'amorce d'intégration UMI comprenait l'extrémité 5' à 3' :

- 28 nucléotides correspondant à un adaptateur ;
- 14 nucléotides dont 12 aléatoires correspondant à l'UMI ;
- 6 nucléotides correspondant à un identifiant d'échantillon ; et
- 15 ▪ 20 nucléotides correspondant à une séquence spécifique des gènes *TRBC1* et *TRBC2* (5').
-

Séquence d'amorces d'intégration de l'UMI :

20 5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGCAGNNNNUNNNUNNNNTAGCTGGTGTGGC
CTTTTGGGTG 3.

L'ADNc obtenu a été purifié à l'aide de billes de purification magnétiques.

Ensuite, 12 dilutions décroissantes ont été réalisées. Chacune d'entre elles a été engagée dans 4 répliques (n = 36) pour la construction d'une bibliothèque NGS ciblée sur les gènes bêta du TCR.

25 B. Première PCR d'enrichissement

Une première étape d'enrichissement de ces gènes a été réalisée par PCR multiplex avec des amorces directes spécifiques des gènes fonctionnels *du TRBV* basées sur la banque de données IMGT (www.IMGT.org). Ces amorces ont été positionnées entre 110 et 250 nucléotides de la région hypervariable du TCR bêta (région CDR3).

Par exemple, la séquence spécifique pour *TRBV2*01* était :
5'ATACTTCTATTGGTACAGACAAATCT'.

L'amorce inverse était complémentaire de l'adaptateur inclus à l'extrémité 5' de l'amorce d'intégration de l'UMI :

5 5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT3'.

Les produits obtenus après ce premier enrichissement ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques de purification.

C. Deuxième PCR d'enrichissement nichée

La totalité des amplicons obtenus a été engagée dans une seconde PCR
10 d'enrichissement. Les amorces de cette seconde PCR ont été emboîtées par rapport aux amorces de la première PCR d'enrichissement.

Les amorces directes étaient spécifiques aux séquences du gène *TRBV* ciblées et sont situées à une distance de 40 à 70 nucléotides du ROI.

Par exemple, la séquence spécifique pour *TRBV2*01* était :

15 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAACTCTGAAGATCCGGTCCACAS'

L'amorce directe comprenait un adaptateur de 21 nucléotides en position 5' de l'amorce.

L'amorce inverse était complémentaire de l'adaptateur inclus à l'extrémité 5' de l'amorce d'intégration de l'UMI :

5'GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCAGTGGTATCAACGCAGTGC3'

20 L'amorce inverse comprenait un adaptateur de 21 nucléotides en position 5'. Les produits de cette PCR 2nd ont été purifiés avec des billes de purification magnétique.

D. Fixation des adaptateurs NGS

Une fraction des amplicons obtenus a été engagée dans une PCR simple. Les amorces
25 avant et arrière étaient spécifiques des adaptateurs inclus aux extrémités 5' des amorces utilisées dans la seconde PCR nichée d'enrichissement.

Nous avons intégré les adaptateurs P5 et P7 ainsi que les MIDs nécessaires au séquençage dans la plateforme MiSeq-Illumina.

E. Séquençage NGS des seconds amplicons d'enrichissement

Le séquençage a été effectué selon la procédure standard. Les réactifs recommandés par Illumina ont été utilisés en condition d'hybridation avec un cycle de 2x 250 cycles. Les lectures générées ont été lues et alignées sur les gènes TCR bêta. Le pourcentage de bases avec un Phred QS < 20 est enregistré pour chaque lecture alignée. La probabilité d'un appel de base incorrect était de 1/ 100 . Une valeur moyenne est calculée pour chaque bibliothèque. La distribution des résultats obtenus pour les 36 bibliothèques évaluées est représentée par un diagramme en boîte dans la figure 3A.

Exemple comparatif 1B - Figure 3B : intégration non ciblée de l'UMI

10 Pour la figure 3B, l'ARN d'un échantillon de PBMC a été extrait et engagé dans une réaction de transcription inverse en utilisant une amorce spécifique pour les gènes *TRBC1* et *TRBC2* :

5'GTGTTCCCACCCGAGGTC3'.

15 Un template Switch Oligo (TSO) est également ajouté lors de la réaction de transcription inverse. Il est biotinylé à l'extrémité 5' et présente le motif suivant dans l'ordre consécutif :

- un adaptateur de 21 bases à l'extrémité 5',
- 12 nucléotides dont 10 aléatoires correspondant à l'UMI ; et
- 3 Guanines en 3'

5'BiosG/TAGCAGGATATCAACGCAAGTANNUNNNNNrGrG3' .

20 Ces 3 guanines permettent au TSO de s'hybrider aux nucléotides C non traités ajoutés par la transcriptase inverse lors de la transcription inverse. Sa séquence est intégrée à l'extrémité 5' de l'ADNc. La distance entre la position du TSO incluant l'UMI et le RIO ne peut être contrôlée. Elle dépend de la longueur du brin d'ARN. L'ADNc obtenu a été purifié à l'aide de billes magnétiques de purification. Ensuite, 8 dilutions décroissantes ont été réalisées. Chacune a été engagée en 2 réplicats (n = 18) pour la construction de bibliothèques NGS ciblées sur les gènes TCR beta. L'enrichissement de ces gènes a été réalisé en utilisant une PCR simplex dans laquelle l'amorce sens est complémentaire de l'adaptateur à l'extrémité 5' du TSO :

5' AAGACTCGGCAGCATCTCCATAGCAGGATATCAACGCAAGTA3'

30 Il comprend un adaptateur de 21 nucléotides à l'extrémité 5'.

L'amorce inverse est complémentaire des gènes *TRBC1* et *TRBC2*. L'amorce inverse comprend également un adaptateur de 21 nucléotides à l'extrémité 5' :

5'GCGATCGTCACTGTTCTCCATCTCTGCTTCTGATGGCTCAAAC3'.

Les produits résultants ont été purifiés avec des billes de purification magnétique.

- 5 Une fraction des amplicons a été engagée dans une PCR simplex. Les amorces avant et arrière étaient spécifiques aux adaptateurs inclus aux extrémités 5' des amorces utilisées dans la PCR d'enrichissement.

- Le but de cette étape était d'intégrer les adaptateurs P5 et P7 ainsi que les MIDs nécessaires au séquençage dans la plateforme MiSeq-Illumina. Le run de séquençage a été réalisé en suivant la procédure standard. Nous avons utilisé les réactifs recommandés par Illumina en condition paired-end avec un run de 2x 250 cycles. Les lectures générées ont été appariées et alignées sur les gènes TCR bêta. Ensuite, le pourcentage de bases avec un Phred QS < 20 a été enregistré pour chaque lecture alignée. Une moyenne a été calculée pour chaque bibliothèque. La distribution des résultats obtenus est représentée par un boxplot dans la figure 3B.
- 10
- 15

Exemple 2

- Dans cet exemple visant à illustrer l'avantage d'enrichir les gènes ciblés dans une bibliothèque NGS par deux PCR nichées spécifiques à ces gènes par rapport à une seule PCR spécifique en termes d'efficacité de séquençage (% de lectures sur cible) ; une série de bibliothèques NGS ciblées sur les gènes bêta du TCR ont été construites avec les deux approches, respectivement exemple 4A et 4B.
- 20

Exemple 2A - Figure 4A : deux PCR d'enrichissement nichées

- Pour l'exemple 2A - Figure 4A, la procédure de construction des bibliothèques ciblées sur les gènes bêta du TCR à partir de l'ARN des PBMC et les conditions de séquençage sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1, Figure 3A. La proportion de lectures alignées sur les séquences d'ADN ciblées par rapport aux lectures brutes totales (on target reads %) est calculée pour chaque bibliothèque. La distribution des résultats est représentée par un box plot sur la figure 4A.
- 25

Exemple comparatif 2B - Figure 4B : PCR à enrichissement unique

- 30 Dans l'Exemple 2B - Figure 4B, l'ARN d'un échantillon de PBMC a été extrait et soumis à une réaction de transcription inverse en utilisant une amorce d'intégration UMI identique à

celle décrite dans l'Exemple 1, Figure 3A. L'ADNc obtenu a été purifié à l'aide de billes magnétiques de purification puis 8 dilutions décroissantes ont été réalisées, et chacune a été engagée en 2 réplicats ($n = 18$) pour la construction de bibliothèques NGS ciblées sur les gènes TCR beta. Une seule PCR d'enrichissement des gènes TCR beta est réalisée dans cet exemple. Les mêmes amorces que celles utilisées dans la 2e PCR d'enrichissement décrite dans l'exemple 1A, figure 3A.

Les produits de cette PCR ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques de purification. Une fraction des amplicons résultants a été engagée dans une PCR simplex. Les amorces avant et arrière étaient spécifiques des adaptateurs inclus aux extrémités 5' des amorces utilisées dans la PCR d'enrichissement. Le but de cette étape était d'intégrer les adaptateurs P5 et P7 et les MID nécessaires au séquençage dans la plateforme MiSeq-Illumina. Le cycle de séquençage a été effectué selon la procédure standard. Les réactifs recommandés par Illumina ont été utilisés en condition paired-end avec un run de 2x 250 cycles. La proportion de lectures alignées sur les gènes cibles du TCR bêta par rapport aux lectures brutes totales (on target reads %) est calculée pour chaque bibliothèque. La distribution des résultats est représentée par un boxplot dans la figure 4B.

Tableau des expressions anglaises dans les figures :

Targeted UMI integration	Intégration ciblée de l'IUM
According to the invention	Selon l'invention
Center of ROI	Centre de l'IUM
RNA or DNA	ARN ou ADN
bp	bp
Targeted DNA sequence (10)	Séquence d'ADN ciblée (10)
UMI integration primer in upstream position	Amorce d'intégration IUM en position amont
UMI integration primer in downstream position	Amorce d'intégration IUM en position aval
Amplification adapter	Adaptateur d'amplification

UMI	IUM
Sample identifier	Identificateur d'échantillon
DNA sequence specific for the targeted DNA sequence	Séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée
Generic adapter	Adaptateur générique
NGS adapter	Adaptateur NGS
R1-R2 overlapping the ROI	R1-R2 chevauchant le ROI
Non-targeted UMI integration	Intégration de l'IUM non ciblée
Uncontrolled distance	Distance non contrôlée
Read	Lecture
Reads not overlap in ROI	Lectures ne se chevauchant pas dans le ROI
% of bases with a QS< 20 per read (library mean)	% de bases avec un QS< 20 par lecture (moyenne de la bibliothèque)
Amplification with 1 specific PCR	Amplification avec 1 PCR spécifique
On-target reads	Lectures sur cible
Amplification with 2 specific PCRs	Amplification avec 2 PCRs spécifiques

CLAIMS

1. Procédé de haute précision pour la détection d'un état médical ou cosmétique, comprenant :
- 5 A. Fournir un échantillon de patient comprenant une séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lequel la séquence d'ADN ciblée est de 20 à 200 bases en amont et de 20 à 200 paires de bases en aval du centre d'une région d'intérêt (ROI, 20), dans lequel la ROI (20) consiste en 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférentiellement de 20 à 50 bases ; et dans laquelle la ROI (20) est associée à l'état médical ou cosmétique ; et la fixation d'un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33') à la séquence d'ADN ciblée (10) en utilisant
- 10 une amorce d'intégration UMI (30, 30') ; dans laquelle l'amorce d'intégration UMI (30, 30') comprend :
- * un adaptateur d'amplification (31, 31'),
 - * un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33'),

15

 - * un identifiant d'échantillon (32, 32') ; et
 - * une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'), dans laquelle l'extrémité 3' est voisine de la séquence d'ADN ciblée (10).
- B. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une première PCR d'enrichissement, obtenant ainsi un premier amplicon d'enrichissement de 200
- 20 à 700 paires de bases, dans lequel le premier amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;
- C. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une seconde PCR d'enrichissement emboîtée, obtenant ainsi un second amplicon d'enrichissement de 200 à 500 paires de bases, dans lequel le second amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;
- 25
- D. Fixer des adaptateurs NGS (60, 61) aux seconds amplicons PCR d'enrichissement ; et
- E. Séquençage des amplicons du second enrichissement par séquençage de nouvelle génération (NGS) ;
- 30 dans laquelle la première PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :

- 5 * une ou plusieurs premières amorces PCR d'enrichissement (40), dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont spécifiques de la séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont en sens direct si l'amorce d'intégration UMI (30) est en aval du ROI (20) ; et dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement sont en sens inverse si l'amorce d'intégration UMI (30') est en amont du ROI (20) ; et
 - * une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) ;
dans lequel la seconde PCR d'enrichissement comprend l'amplification avec :
 - 10 * une ou plusieurs secondes amorces PCR d'enrichissement (50), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont spécifiques pour le ROI (20) ou pour les séquences d'ADN ciblées (10), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont imbriquées par rapport aux premières amorces PCR d'enrichissement (40) ; et dans lesquelles la seconde amorce PCR d'enrichissement (50) comprend un adaptateur générique (51) à l'extrémité 5' ; et
 - 15 * une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31), dans laquelle l'amorce (52) comprend un adaptateur générique (53).
- 20 2. Procédé de la revendication 1, dans lequel la séquence d'ADN ciblée (10) a une longueur de 20 à 200 nucléotides, de préférence de 20 à 100 nucléotides à partir du centre du ROI.
 3. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le ROI (20) est constitué de 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférentiellement de 20 à 50 bases.
 - 25 4. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34') a une longueur de 10 à 60 nucléotides, de préférence de 15 à 25 nucléotides, et encore plus préférentiellement de 18 à 24 nucléotides.
 - 30 5. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'UMI a une longueur de 5 à 20 nucléotides, de préférence de 8 à 18 nucléotides, encore plus préférentiellement de 12 à 15, et encore plus préférentiellement de 14 nucléotides.

6. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'UMI est une séquence aléatoire, une séquence semi-aléatoire ou une combinaison de celles-ci.
7. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la partie aléatoire de la séquence semi-aléatoire est de 2 à 12 bases.
8. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'UMI consiste en l'ordre de base consécutif suivant :
- 4 bases aléatoires,
 - une base fixe,
 - 4 bases aléatoires,
 - une base fixe, et
 - 4 bases aléatoires.
9. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la région d'intérêt est un récepteur de cellules T ou un récepteur de cellules B, de préférence un récepteur de cellules T.
10. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la condition médicale est le cancer, de préférence le cancer du sein ou le cancer gastro-intestinal.
11. Méthode de l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la condition médicale est un cancer récidiviste.
12. Procédé de l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre la détermination d'un traitement en fonction de la région d'intérêt détectée.
13. Système pour la détection de haute précision d'une condition médicale ou cosmétique, comprenant des moyens configurés pour réaliser les étapes suivantes :
- A. Fournir un échantillon de patient comprenant une séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lequel la séquence d'ADN ciblée est de 20 à 200 bases en amont et de 20 à 200 paires de bases en aval du centre d'une région d'intérêt (ROI, 20), dans lequel la ROI (20) consiste en 1 à 100, de préférence de 10 à 50, et encore plus préférablement de 20 à 50 bases ; et dans laquelle la ROI (20) est associée à l'état médical ou cosmétique ; et la fixation d'un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33') à la séquence d'ADN ciblée (10) en utilisant une amorce d'intégration UMI (30, 30') ; dans laquelle l'amorce d'intégration UMI (30, 30') comprend :

- 5
 - * un adaptateur d'amplification (31, 31'),
 - * un identifiant moléculaire unique (UMI, 33, 33'),
 - * un identifiant d'échantillon (32, 32') ; et
 - * une séquence d'ADN spécifique de la séquence d'ADN ciblée (34, 34'),
dans laquelle l'extrémité 3' est voisine de la séquence d'ADN ciblée
(10).
- 10 B. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une première PCR d'enrichissement, obtenant ainsi un premier amplicon d'enrichissement de 200 à 700 paires de bases, dans lequel le premier amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;
- 15 C. Amplifier la séquence d'ADN ciblée (10) par une seconde PCR d'enrichissement emboîtée, obtenant ainsi un second amplicon d'enrichissement de 200 à 500 paires de bases, dans lequel le second amplicon d'enrichissement comprend le ROI (20) ;
- 20 D. Fixer des adaptateurs NGS (60, 61) aux seconds amplicons PCR d'enrichissement ; et
- E. Séquençage des amplicons du second enrichissement par séquençage de nouvelle génération (NGS) ;
dans laquelle la première PCR d'enrichissement comprend l'amplification
avec :
 - 25
 - * une ou plusieurs premières amorces PCR d'enrichissement (40), dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont spécifiques de la séquence d'ADN ciblée (10) ; dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement (40) sont en sens direct si l'amorce d'intégration UMI (30) est en aval du ROI (20) ; et dans lesquelles les premières amorces PCR d'enrichissement sont en sens inverse si l'amorce d'intégration UMI (30') est en amont du ROI (20) ; et
 - * une amorce (41) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31) ;
dans laquelle la seconde PCR d'enrichissement comprend l'amplification
avec :
 - 30
 - * une ou plusieurs secondes amorces PCR d'enrichissement (50), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont

- 5
- spécifiques pour le ROI (20) ou pour les séquences d'ADN ciblées (10), dans lesquelles les secondes amorces PCR d'enrichissement (50) sont imbriquées par rapport aux premières amorces PCR d'enrichissement (40) ; et dans lesquelles la seconde amorce PCR d'enrichissement (50) comprend un adaptateur générique (51) à l'extrémité 5' ; et
- * une amorce (52) complémentaire de l'adaptateur d'amplification (31), dans laquelle l'amorce (52) comprend un adaptateur générique (53).

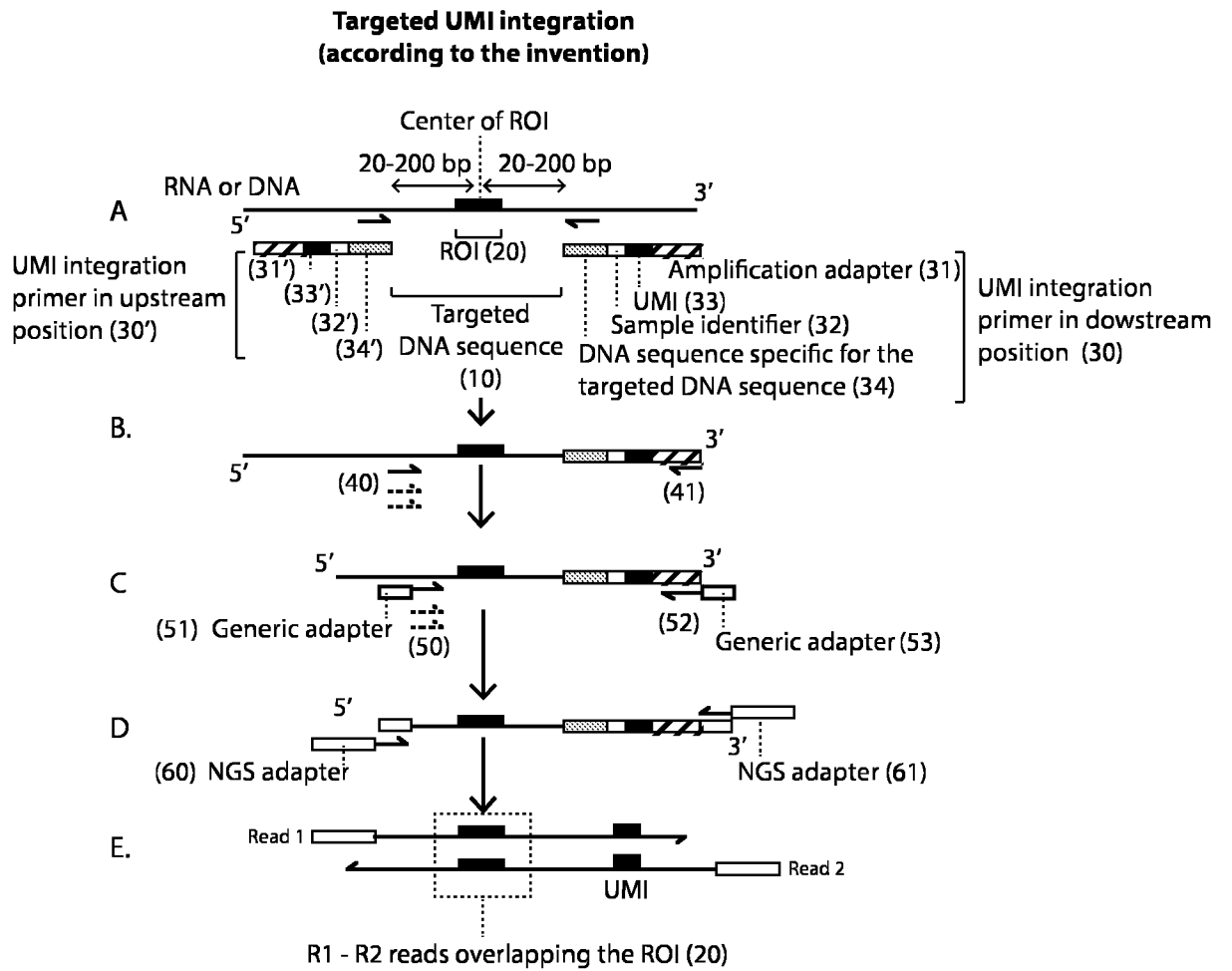


Figure 1

Non-targeted UMI integration

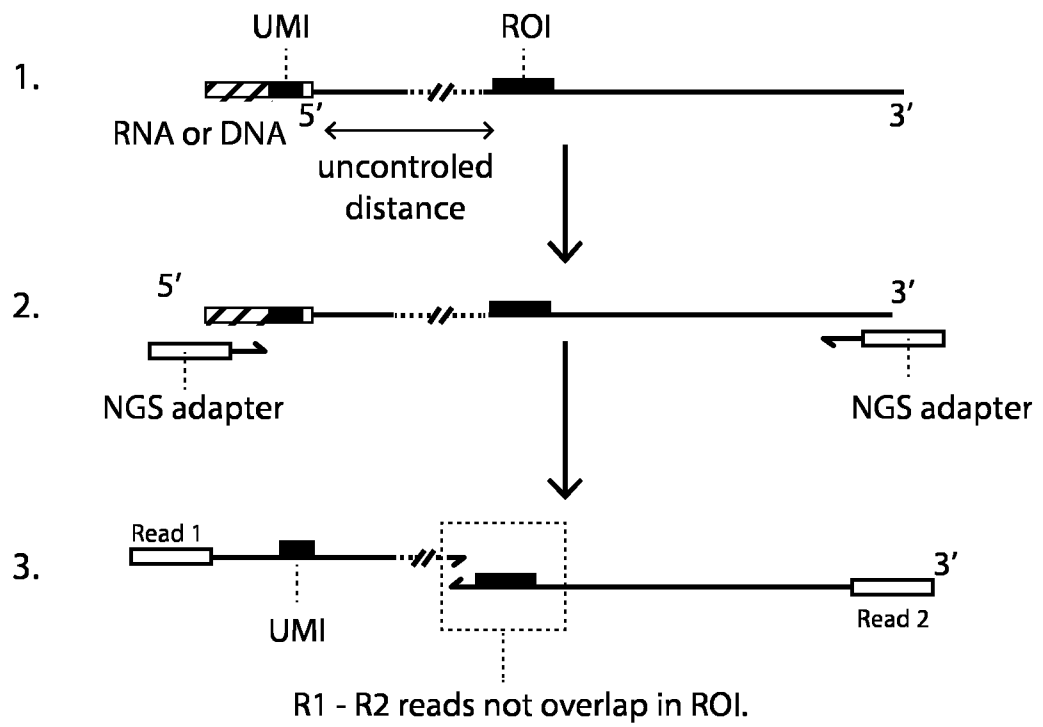


Figure 2

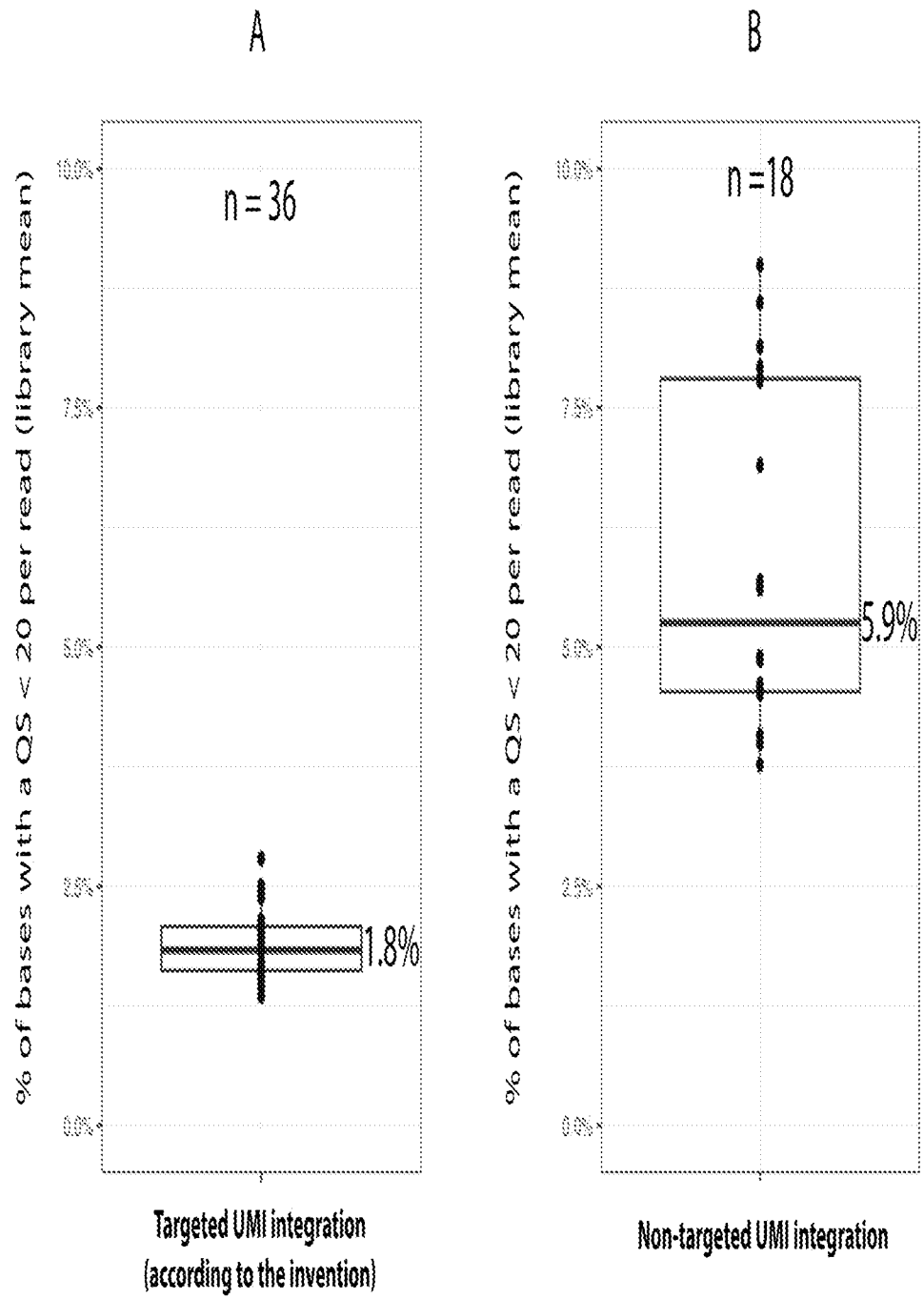


Figure 3

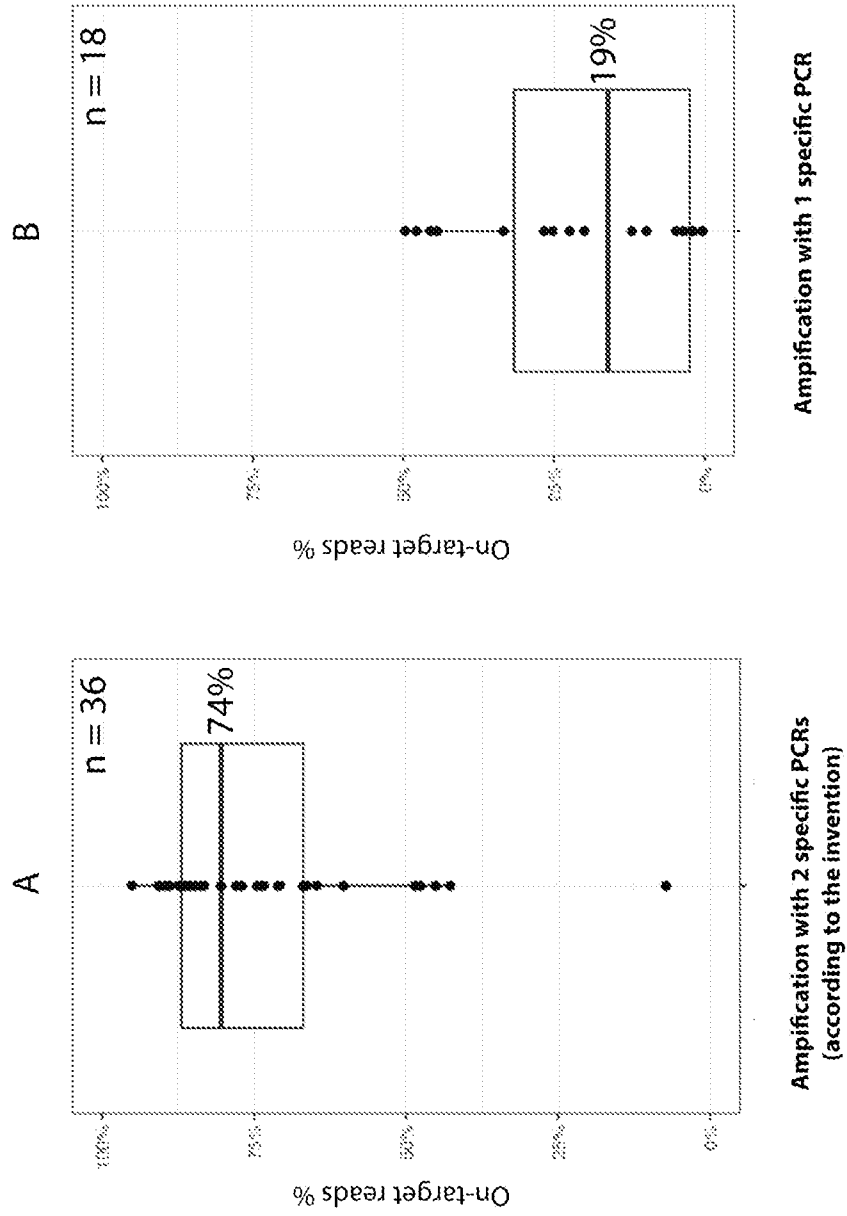


Figure 4

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE SEQUALIS.UMI
Demande nationale belge n° 202305056	Date du dépôt 30-01-2023
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) GRAND HOPITAL DE CHARLEROI	
Date de la requête d'une recherche de type international 11-02-2023	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN83270
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202305056

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/6806 C12Q1/6886
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2021/139970 A1 (CHANG CHRISTINA [US] ET AL) 13 mai 2021 (2021-05-13) * Fig. 3 and [0188]-[0194], [0190], [0195] *	1-13
A	----- US 2019/078148 A1 (ZHENG ZONGLI [HK]) 14 mars 2019 (2019-03-14) * Fig. 1 et [009]-[0012] *	1-13
A,D	----- US 2021/355533 A1 (PERERA JASON [US] ET AL) 18 novembre 2021 (2021-11-18) cité dans la demande * [0004]-[0009] and [0141]-[0146] *	1-13

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

10 août 2023

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lapopin, Laurence

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202305056

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2021139970 A1	13-05-2021	CN 114729350 A	08-07-2022
		EP 4055160 A1	14-09-2022
		JP 2023500679 A	10-01-2023
		US 2021139970 A1	13-05-2021
		WO 2021092386 A1	14-05-2021

US 2019078148 A1	14-03-2019	CN 108220392 A	29-06-2018
		EP 3545106 A1	02-10-2019
		JP 6998404 B2	04-02-2022
		JP 2020508083 A	19-03-2020
		US 2019078148 A1	14-03-2019
WO 2019023924 A1	07-02-2019		

US 2021355533 A1	18-11-2021	AU 2021259958 A1	17-11-2022
		CA 3174332 A1	28-10-2021
		EP 4139477 A1	01-03-2023
		JP 2023515270 A	12-04-2023
		US 2021355533 A1	18-11-2021
		US 2023121729 A1	20-04-2023
WO 2021217181 A1	28-10-2021		



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN83270	Date du dépôt(jour/mois/année) 30.01.2023	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE202305056
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12Q1/6806 C12Q1/6886			
Déposant GRAND HOPITAL DE CHARLEROI			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Juillet 2022)	Examineur Lapopin, Laurence
--	--------------------------------

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée sur la base d'un listage des séquences
 - a. faisant partie de la demande telle que déposée.
 - b. remis postérieurement à la date du dépôt aux fins de la recherche,
 - accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée.
3. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée dans la mesure où une opinion valable pouvait être formulée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	1-12
	Non : Revendications	13
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-13
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-13
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Item 5

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1 Introduction

Les présentes revendications concernent un système et une méthode de détection hautement précise d'une maladie ou d'un état cosmétique comprenant

- a) fournir un échantillon comprenant un ADN cible comprenant une région d'intérêt (ROI) associée à ladite condition, dans lequel la séquence d'ADN cible est de 20 à 200 bases en amont et de 20 à 200 paires de bases en aval du centre de la ROI, et dans lequel la ROI est constituée de 1 à 100 bases et fixer une UMI à l'aide d'une amorce d'intégration comprenant : un adaptateur, une UMI, un identifiant d'échantillon et une séquence spécifique de cible d'ADN,
- b) amplifier en générant ainsi un premier amplicon d'une longueur de 200 à 700 pb,
- c) amplifier une deuxième fois (PCR nichée) générant ainsi un deuxième amplicon de 200-500 pb,
- d) fixer l'adaptateur de séquençage aux deuxièmes amplicons et
- e) séquencer

2 Il est fait référence au document suivant :

Il est fait référence aux documents suivants :

- | | |
|----|---|
| D1 | US 2021/139970 A1 (CHANG CHRISTINA [US] ET AL) 13 mai 2021 (2021-05-13) |
| D2 | US 2019/078148 A1 (ZHENG ZONGLI [HK]) 14 mars 2019 (2019-03-14) |
| D3 | US 2021/355533 A1 (PERERA JASON [US] ET AL) 18 novembre 2021 (2021-11-18)cité dans la demande |

D1 divulgue (Fig. 3 et [0188]-[0194]) un procédé de détection de marqueurs du cancer tel que le TCR comprenant

- 1) générer par reverse transcription un ADNc cible (TNA) comprenant la région d'intérêt (ROI) attachée à une structure comprenant une région spécifique l'ADN cible 3'- (312), un identifiant de cellule/échantillon (320), un identifiant moléculaire unique (318) et un site de liaison d'amorce (316)
- 2) amplifier à l'aide du site de liaison d'amorce (316) et d'une amorce flanquant la région cible, obtenant ainsi un fragment/amplicon qui comprend la région cible,
- 3) amplifier par PCR nichée obtenant ainsi un amplicon comprenant la région cible qui est plus petite que l'amplicon précédent
- 4) ajout d'adaptateurs de séquençage (NGS)

Méthode selon laquelle chaque identifiant (318) et (320) peut avoir une longueur de 5 à 20 nucléotides.

Les séquences identifiantes (318) et (320) correspondent à des séquences stochastiques, c'est-à-dire des séquences aléatoires.

D1 divulgue également un système comprenant des moyens pour faire la-dite méthode ([0195]).

D1 ne divulgue pas les tailles des amplicons, ni la position du RIO par rapport au fragment d'ADN cible.

D2 divulgue (Fig. 1 et [009]-[0012]) un procédé pour générer des amplicons adaptés au NGS et détecter un cancer.

Le procédé comprend la fixation d'un adaptateur comprenant un code à barres (identifiant unique) et des sites de liaison d'amorce. Le procédé comprend en outre l'enrichissement des séquences cibles à l'aide d'une PCR nichée avant le séquençage, les amorces s'hybrident à une région qui se trouve à environ 1-100 nucléotides de la région cible (ROI).

D2 ne divulgue pas une méthode comprenant les étapes comme définies dans la revendication 1.

D3 divulgue ([0004]-[0009]) un système et un procédé de profilage du répertoire des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et des récepteurs des lymphocytes B (BCR) à l'aide du séquençage de nouvelle génération (NGS) pour le diagnostic du cancer

Les procédés utilisent des sondes de capture hybrides pour enrichir l'échantillon dans la séquence cible avant de construire la bibliothèque de séquençage et ainsi augmenter la sensibilité du séquençage.

La bibliothèque de séquençage est construite en utilisant des adaptateurs de séquençage comprenant dans l'ordre de 5' à 3', une région d'amplification, une région d'étiquette d'échantillon, une UMI et une région d'ancrage qui sont ajoutés aux fragments d'ADNc enrichis ([0141]-[0146]).

D3 ne divulgue pas une méthode comprenant les étapes comme définies dans la revendication 1.

3 **Nouveauté**

Concernant le système de la revendication 13. Ce dernier est simplement adapté à effectuer la méthode de la revendication 1. Son utilisation n'est donc pas une caractéristique limitative. Le-dit système est défini par des moyens utiles à effectuer la dite méthode mais qui ne sont eux-mêmes définis par aucune caractéristiques techniques. Par conséquent le système décrit dans le document D1 apparaît avoir des moyens utiles à faire la même chose et donc anticipe le sujet de la revendication 13 qui n'est pas nouvelle.

4 **Activité inventive**

4.1 **D1** est considéré comme l'état de la technique le plus proche pour les revendications 1-12.

4.2 **La revendication 1** diffère de D1 par les tailles des amplicons et la position du ROI par rapport au fragment d'ADN cible.

La description est silencieuse quant à un effet technique associé à ces tailles ou longueurs associées aux amplicons et à la position relative du ROI dans ADN cible qui irait au delà de l'effet déjà démontre dans D1 soit la haute précision de la détection d'une condition associé à la présence du ROI. Haute précision qui est atteinte grâce aux deux étapes d'amplification qui permet l'enrichissement de la séquence d'ADN cible comprenant le ROI.

Le problème technique sous-jacent à la revendication 1 peut-être donc formulé comme la provision d'une méthode alternative.

En absence d'effet technique surprenant associé à ces tailles/longueurs et position des séquences, leur choix est considéré comme arbitraire. Par conséquent la revendication 1 n'implique d'activité inventive.

4.3 Le même raisonnement que pour la revendication 1 s'applique pour les mêmes raisons aux revendications 2 et 3.

- 4.4 les revendications 4-12 dépendantes de la revendication 1 n'apparaissent pas contenir des caractéristiques qui en combinaison avec celles des revendications dont elles dépendent pourrait satisfaire aux exigences de l'activité inventive car les caractéristiques des revendications 4-8 couvrent des modes de réalisations de la demande qui tombent dans le domaine des connaissances générales de l'homme du métier et que ces caractéristiques n'apparaissent pas associées à un effet technique qui irait au-delà de ce que l'homme du métier pourrait immédiatement associer avec celles-ci.

Item 8

La revendication 1 réfère à la détection d'un état cosmétique. La portée de ce terme est très large et inclue une large possibilité de conditions. Cependant, la description (p. 12 -21) et en particulier la partie expérimentale démontre l'application de la méthode plus spécifiquement pour les cancers et les biomarqueurs qui leur sont associés. Par conséquent, l'extension de la portée de la revendication au-delà des conditions associées aux cancers ne paraît être suffisamment supportée par la description.