



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35216 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 15/00; C12N 15/13; C12N 15/11**
- (43) Date de publication : **03.07.2014**

- 
- (21) N° Dépôt : **35213**
- (22) Date de Dépôt : **13.09.2012**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR, RUE MOHAMED ELJAZOULI MADINAT ALIRFANE RABAT (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Denise KOTTWITZ ; El Hassan, SEFRIOUI ; Manale EL AMRANI**
- (74) Mandataire : **MOHAMED EL AMRANI**

- 
- (54) Titre : **SONDES ET AMORCES POUR LA DETECTION DU GENE BCR-ABL EN REACTION DUPLEX**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation de nouvelles sondes, amorces, sets d'amorces, sets de sondes et amorces en qPCR pour la détection et la quantification de la translocation BCR-ABL et un gène contrôle en réaction simplex ou multiplex. En quantifiant le gène BCR-ABL et le gène contrôle, la qPCR de la présente invention permettra la détection de la leucémie chronique myéloïde (LMC), le suivie de son traitement ainsi que la maladie résiduelle.

BCR-ABL ou ABL1 en qPCR sont attachées à des entités fluorescentes (reporters) et non fluorescentes (quencher). Le reporteur peut être FAM, JOE ou YY ou similaires, attaché à l'extrémité 5' et le quencher peut être BBQ, BHQ1, ou TAMRA ou similaires attaché à l'extrémité 3'.

7. Méthode selon les revendications 1 à 6, où la détection des gènes BCR-ABL et ABL1 dans un échantillon test est effectuée de façon séparée (Simplexe) ou simultanée (Multiplexe) dans un même puits de qPCR.
8. Méthode selon les revendications 1 à 7, où les sondes et amorces du gène permet la détection simultanée des 2 transcrits de BCR-ABL, à savoir b2a3 et b3a2.
9. Méthode selon les revendications 1 à 8, où l'utilisation de ladite méthode comprend au moins une des techniques PCR, PCR en temps réel (qPCR) ou transcriptase reverse PCR (RT-PCR).
10. Nouvelle application de la méthode des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle permet le diagnostique et le suivi de traitement de la LMC et de la maladie résiduelle.

35216

03 JUIL 2014

**Abrégé descriptif****Sondes et amorces pour détecter le gène BCR-ABL en réaction duplex**

La présente invention concerne l'utilisation de nouvelles sondes, amorces, sets d'amorces, sets de sondes et amorces en qPCR pour la détection et la quantification de la translocation BCR-ABL et un gène contrôle en réaction simplex ou multiplex.

En quantifiant le gène BCR-ABL et le gène contrôle, la qPCR de la présente invention permettra la détection de la leucémie chronique myéloïde (LMC), le suivi de son traitement ainsi que la maladie résiduelle.

## DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne l'utilisation de nouvelles sondes, amorces, sets d'amorces, sets de sondes et amorces en qPCR pour la détection et la quantification de la translocation BCR-ABL et un gène contrôle en réaction simplexe ou multiplexe. En quantifiant le gène BCR-ABL et le gène contrôle, la qPCR de la présente invention permettra la détection de la leucémie chronique myéloïde (LMC), le suivi du traitement ainsi que de la maladie résiduelle.

## ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie caractérisée par la présence du chromosome de Philadelphie qui est le chromosome 22 raccourci sur son bras long par une translocation  $t(9,22)(q34;q11)$ . Cet échange entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 est constamment présent dans les cellules des patients atteints de LMC et il en résulte un gène de fusion appelé *BCR-ABL* fonctionnel qui sera transcrit en ARNm chimérique (Shtivelman, 1985. Nature 1985; 315:550-4) qui est traduit en protéines de fusion *bcr-abl*, responsable de la LMC.

La translocation BCR-ABL ( $t(9,22)(q34;q11)$ ) est présente chez 90-95% des patients LMC et 20-25% chez les patients de la leucémie lymphoïde aigüe (LLA) (Prist, 1980; Blood 56: 15-22). La majorité des translocations de la LMC frappe la région du 'major breakpoint cluster région' (M-bcr) au niveau du gène BCR et résulte en 2 transcrits qui sont *b2a2* et *b3a2* codant pour une protéine de fusion P210. La détection et la quantification des 2 derniers transcrits permettront de statuer sur l'évolution de la LMC. En effet, l'ARNm du gène BCR-ABL peut être détecté et quantifié spécifiquement et efficacement par la méthode RT-PCR parce que ce gène de fusion est spécifique à la LMC et peut être utilisé comme marqueur permettant d'identifier cette maladie.

Le critère fondamental du diagnostic de la LMC ou LLA est la présence de gène de fusion *BCR-ABL*, qui peut être mis en évidence par des méthodes cytogénétiques actuelles comme celles du caryotype, la FISH (Fluorescent in situ hybridation) ou d'examen hématologiques. Cependant, ces méthodes manquent surtout d'essais quantitatifs et qualitatifs, elles sont moins spécifiques, utilisent des hybridations

complexes ou des isotopes, prennent énormément de temps (plusieurs jours), peuvent être invasives (utilisation de la moelle osseuse), ou plus coûteuses. De plus, ces méthodes cytogénétiques peuvent détecter seulement une cellule LMC sur 500 cellules et donc ne peuvent pas être utilisées dans le cas du suivi de traitement de la LMC ni dans le cas de la maladie résiduelle qui nécessite une grande sensibilité (détection d'une cellule LMC sur 100000 cellules).

C'est pour les raisons citées ci-dessus qu'il est préférable de chercher des méthodes de quantification de BCR-ABL avec plus de sensibilité et de fiabilité, de meilleures répétabilité quantitatives et qualitatives, moins coûteuses et pouvant facilement détecter la maladie résiduelle.

Une méthode alternative à l'art antérieur décrit ci-dessus est la PCR quantitative en temps réel (qPCR) qui a été bien décrite auparavant pour l'amplification et la détection de différents gènes dont BCR-ABL (Fossey S et al ; Mol Diagn. 2005;9(4):187-93; Gibson et al, 1996 Genomic Res 6 :995-1001).

Pour la quantification d'un gène cible, la qPCR utilise en parallèle un gène contrôle 'housekeeping gene' exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les cellules du corps et qui facilitera la normalisation et la quantification du gène ciblé. Dans le cas de BCR-ABL, plusieurs gènes contrôles ont été testés comme GAPDH, beta-actine, microglobuline, G6PDH (Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase) (Ullmannov. V, 2003 ; Folia Biologica (Praha) 49, 211-216 (2003). Plus tard, une étude incluant 38 laboratoires Nord Américains a étudié certains gènes contrôles en parallèle pour quantifier BCR-ABL (Tong et al ; 2007 ; Journal of molecular Diagnostics, vol 9, N4 : p 421-429). Dans cette étude, l'amplification et la détection de BCR-ABL et les gènes contrôles a été faite avec des séquences nucléotidiques spécifiques tout en utilisant la qPCR en format simplex. Avec cette méthode, la sensibilité et le coût reste raisonnables et meilleurs que l'art antérieur.

Il est souhaitable d'identifier une méthode de qPCR pour quantifier BCR-ABL qui peut être encore plus sensible et plus fiable mais surtout moins coûteuse que l'art antérieur décrit ci-dessus.

## EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention préconise l'utilisation de nouveaux sets de sondes et d'amorces et d'un procédé de qPCR en réaction simplexe ou multiplexe pour la détection et la quantification du gène BCR-ABL permettant le diagnostique de la LMC, le suivi de son traitement ainsi que la maladie résiduelle.

Le procédé de la présente invention (7) améliore les autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet a) de gagner en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces de BCR-ABL et ABL1 plus spécifiques et plus sensibles que ceux citées dans l'art antérieur b) une réduction en cout de consommables et en temps de réalisation ainsi qu'en fiabilité car l'amplification des gènes BCR-ABL et de ABL1 se fait simultanément dans le même puits de qPCR c) de détecter, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, les 2 variantes de la LMC b3a2 et b2a2, étant donné que les sondes et amorces de BCR-ABL de la présente invention sont désignées de tel manière à détecter les 2 types de transcrits, ce qui permettra un gain en temps supplémentaire.

Selon une caractéristique de l'invention, la quantification des gènes cibles se fait par qPCR en différentes étapes a) synthèse des nouvelles séquences nucléotidique de sondes et amorces qui vont se fixer spécifiquement sur BCR-ABL ou à ABL1 (b) quantification de BCR-ABL sur le chromosome 22 en obtenant un nombre de copie de gène pour BCR-ABL c) quantification de ABL1 sur le chromosome 9 en obtenant un nombre de copie de gène pour ABL1 d) comparaison du nombre de copie de gène BCR-ABL1 à celui de ABL1 en obtenant un ratio nombre de copie de gène BCR-ABL1 par apport au nombre de copie du gène ABL1 (BCR-ABL/ABL1) e) l'évolution de ce rapport après le traitement de la LMC, permet de savoir si un patient a bien répondu ou non au traitement. Une réduction du rapport BCR-ABL/ABL1 après traitement suggère une réponse positive f) en accordance avec (e), le rapport BCR-ABL/ABL1 permet aussi de détecter la maladie résiduelle, difficile à détecter avec les méthodes antérieures, vue leur faible sensibilité de détection.

Selon une autre caractéristique de l'invention, a) les amorces permettant la détection du transcrit BCR-ABL dans un test échantillon ont des séquences d'oligonucleotides sélectionnées parmi un groupe de : SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, et

SEQ ID NO :4, b) les amorces pour détecter le gène contrôle ABL1 dans un test échantillon ont des séquences d'oligonucléotides sélectionnées parmi un groupe de : SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7, et SEQ ID NO :8.

En accord avec cette invention,

- a) la sonde pour détecter BCR-ABL dans un test échantillon a une séquence : SEQ ID : 9.
- b) la sonde pour détecter ABL1 dans un test échantillon a une séquence SEQ ID : 10.

En accord aussi avec cette invention, les sets d'amorces pour amplifier BCR-ABL ou ABL1 dans un test échantillon inclus

- a) au moins pour BCR-ABL une amorce forward ayant une séquence sélectionnée parmi le groupe : SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, et une amorce reverse ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4
- b) au moins pour ABL1, une amorce forward ayant une séquence parmi le group : SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 , et une amorce reverse ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO :7, SEQ ID NO : 8.

La présente invention préconise aussi une méthode pour la détection de BCR-ABL ou ABL1 dans un test échantillon. Cette méthode est divisée en plusieurs étapes :

- a) Pour BCR-ABL, mettre en contact un test échantillon avec au moins une amorce forward ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2, et au moins une amorce reverse sélectionnée parmi SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4 dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible.
- b) Pour ABL1, mettre en contact un test échantillon avec au moins une amorce forward ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 6, et au moins une amorce reverse sélectionnée parmi SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 8 dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible; et c) détecter l'hybridation de la séquence cible et au moins une sonde pour indiquer la présence de BCR-ABL ou ABL1 dans un test échantillon. Pour BCR-ABL, la sonde a une séquence SEQ ID NO : 9 et pour ABL1, la sonde a une séquence SEQ ID NO : 10.

En accord avec la méthode d'amplification de la présente invention, le gène décrit ci dessus consiste à mettre le test échantillon dans une réaction d'amplification en présence de réactifs d'amplification. La réaction d'amplification peut être au moins une PCR, qPCR ou RT-PCR.

Selon cette invention et en accordance avec, au moins une sonde contient une unité fluorescente (reporter) attachée à la région 5' d'ADN. En plus au moins une sonde peut contenir une partie quencher à la région 3' D'ADN. La quantification de l'unité fluorescence permet la quantification du gène cible (BCR-ABL ou ABL1).

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'amplification de BCR-ABL et ABL1 par la qPCR de la présente invention peuvent se faire en réaction simplexe ou multiplexe.



## BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

**Figure 1a** : Graphique Delta Rn-versus- cycle threshold (Ct) pour BCR-ABL en format simplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (4pg-25ng) ont été utilisées.

**Figure 1b** : Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour BCR-ABL en format simplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (4pg-25ng) ont été utilisées.

**Figure 2** : Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour BCR-ABL en format simplexe. La lignée cellulaire leucémique K562, un échantillon de sang d'un patient LMC et un autre d'un individu control subissant une qPCR de la présente invention. 9 concentrations d'ADNc (0,16pg-25ng) ont été utilisées.

**Figure 3a** : Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour ABL en format multiplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (20pg-25ng) on été utilisées. Les courbes des valeurs Ct des échantillons d'ADNc dans chaque puits du triplicata ainsi que la courbe moyenne sont montrées.

**Figure 3b** : Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour BCR-ABL en format multiplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (4pg-25ng) on été utilisées. Les courbes des valeurs Ct des échantillons d'ADNc dans chaque puits du triplicata ainsi que la courbe moyenne sont montrées.

**Figure 4a** : Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour ABL en format simplexe et multiplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 6 concentrations d'ADNc (20pg-25ng) on été utilisées. Les courbes moyennes des valeurs Ct des échantillons d'ADNc du triplicata sont montrées.

**Figure 4b :** Courbe standard Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc pour BCR-ABL en format simplexe et multiplexe. La lignée cellulaire leucémique K562 subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (20pg-25ng) sont utilisées. Les courbes moyennes des valeurs Ct des échantillons d'ADNc du triplicata sont montrées.

## EXPOSE DETAILLE

La présente invention concerne des sondes, amorces, set d'amorces, set de sondes et amorces qui peuvent être utilisés pour amplifier, détecter et quantifier le gène BCR-ABL ou le gène contrôle ABL1 dans un échantillon test.

La présente invention concerne aussi la méthode de détection de BCR-ABL et d'ABL1 dans un échantillon test en utilisant les sets d'amorces et sondes cités ci-dessus. Les sets d'amorces et sondes de la présente invention permettent une meilleure sensibilité et spécificité pour détecter BCR-ABL et ABL1.

Selon la présente invention, l'amplification de BCR-ABL et du gène contrôle ABL1 se fait au moins en qPCR en format simplexe ou multiplexe permettant ainsi une meilleure quantification de BCR-ABL et un gain en temps et en coût.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la quantification plus sensible et plus spécifique de BCR-ABL permettra un meilleur suivi du traitement de la LMC ainsi que la maladie résiduelle.

Le mot 'BCR-ABL' ou t(9,22) décrit dans la présente invention est une translocation entre le gène ABL1 du chromosome 9 et le breakpoint cluster région (BCR) sur le chromosome 22.

La détection et la quantification de BCR-ABL peut supporter le diagnostic clinique LMC, le suivi de son traitement et le suivi de la maladie résiduelle.

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

Le mot amplification de gène comme utilisé dans cette invention 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 desoxyribonucléotide (ADN) ou un acide ribonucléotide (ARN).

Le mot 'oligonucléotide' comme utilisé ici est une séquence composée d'ADN ou d'ARN ou leur combinaison avec une longueur qui varie de 10 à 70 nucléotides. Les oligonucléotides peuvent être synthétisés avec différentes méthodes mais pas limitées à celle de la synthèse 5'-3' basée sur l'utilisation des groupes protégeant beta-ctanoethyl phosphate (Rosenthal et al, Terahedron Letter 24 : 1691, 1983; Gait et al, Nuc Acids Res 4: 1135, 1977) ou la méthode des phosphochloridites (Matteucci J AM CHEM SOC 103: 3185-91, 1981).

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

Le mot 'sonde' représente une séquence nucléotidique qui forme une structure hybride avec une séquence cible dans une molécule d'un échantillon test.

Le mot 'transcription inverse' comme utilisé dans cette invention réfère à une méthode permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de molécule d'ARN. L'ADNc peut être utilisée dans la méthode PCR.

Le mot 'PCR' (polymerase chain reaction) de la présente invention réfère à une méthode dont un échantillon d'ADN ou ADNc est ajouté dans une solution en présence de 2 oligonucleotides amorces (forward et reverse) ; de nucléotides non attachés (exemple les dNTPs) ; et de l'enzyme ADN polymérase (préférentiellement la Taq polymérase qui résiste à la chaleur) qui catalyse la formation d'ADN à partir des 2 amorces et dNTPs. La solution est chauffée à 94-96 C° pour dénaturer la molécule d'ADN et former 2 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-PCR' (reverse transcriptase-PCR) de la présente invention représente une méthode de PCR dont le produit de départ n'est pas directement un ADN mais un ARN traduit en ADNc après transcription inverse.

Le mot 'qPCR' (quantitative PCR ou real time RT-PCR) cité dans la présente invention réfère à une méthode de PCR permettant l'étude des produits de la réaction PCR durant les premières étapes d'amplification de l'ADN. La détection des produits de PCR se fait grâce à 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. De ce fait, l'intensité du signal de la fluorescence mesurée au cours la réaction d'amplification est proportionnelle au nombre de produits nouvellement formés (amplicons). La mesure en ADN ou ADNc se fait en logarithme. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par qPCR, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales.

Parmi les sondes les plus utilisées en qPCR on trouve les sondes TaqMan et molecular beacons qui utilisent l'activité exonucléase 5 fluorogénique de l'enzyme Taq polymérase pour mesurer la quantité de la séquence d'ADN dans un échantillon test.

Préférentiellement, dans la présente invention, la qPCR est réalisée en utilisant les sondes TaqMan avec un analyseur d'amplification comme ABI PRISM 7900HT 'sequence detection system' qui est un system de screening qui peut détecter et quantifier des acides nucléiques. La quantité de BCR-ABL et ABL1 est calculée par le logiciel intégré dans le systeme ABI PRISM 7900HT en utilisant la méthode de la courbe standard. Selon une autre caractéristique de la présente invention, le reporteur de la sonde peut être FAM, JOE, YAKYE (YY) et le quencher BBQ, BHQ1, ou TAMRA.

Le mot 'gène contrôle' comme utilisé dans ou 'housekeeping gene' représente un gène exprimé en général de façon similaire par toutes les cellules d'un organisme. Parmi les gènes contrôle, on trouve le glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), l'albumine, la beta-actine, et ABL1.

Le mot simplexe de la présente invention réfère à un essai qui ne se déroule pas simultanément avec d'autres essais. Dans notre invention, la qPCR en simplexe reflète la détection de nombre de copies d'un seul gène dans un tube de réaction.

Le mot multiplexe de la présente invention réfère à un essai qui se déroule simultanément avec au moins un autre essai. La qPCR en multiplexe reflète la détection du nombre de copies d'au moins 2 gènes dans un même tube de réaction. Par exemple, dans la présente invention, les 2 gènes BCR-ABL et ABL1 sont détectés simultanément par qPCR.

Le mot 'échantillon test' comme utilisé dans la présente invention réfère à un échantillon de sang, de moelle osseuse, de cellules primaires, lignées cellulaires ou autre tissus et où des cellules LMC ou LLA ou autres cellules leucémiques, exprimant la translocation BCR-ABL, peuvent résider. L'échantillon test de la présente invention peut être d'origine humaine ou autre animal exprimant le gène MUCOL1 qui peut être amplifié en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

La qPCR de la présente invention permet de déterminer le nombre de copies du gène BCR-ABL dans des cellules humains en quantifiant le nombre de copies de BCR-ABL relative à un gène contrôle. Le gène contrôle ici est ABL1.

**L'exemple 1** décrit un protocole utilisé dans le test de qPCR de la présente invention. Le protocole décrit l'étape d'extraction d'ARN, de synthèse d'ADNc et de qPCR.

**L'exemple 2** montre la performance de la qPCR de la présente invention pour détecter le gène BCR-ABL dans la lignée leucémique (LMC) humaine K562, dans le sang d'un patient LMC ainsi que dans le sang d'un individu control.

La performance de la qPCR de la présente invention est suivant les normes IVD internationales ( $R^2 > 0,95$ , slope entre -3,0 et 3,9 et efficacité proche de 100) avec des courbes standards (quantité d'ADNc de K562-vs-valeurs Ct) à efficacité de 100,02 et 100,44 et un  $R^2$  de 0,993 et 0,998 respectivement pour Figure 1b et Figure 2. La courbe d'amplification cycle-vs-Delta Rn (Figure 1a) montre aussi une parfaite allure. Le patient LMC positif pour BCR-ABL par la méthode FISH est bien confirmé pour sa positivité dans la présente invention avec un Ct=32,5 (cercle, Figure 2) alors que l'individu control est négatif pour BCR-ABL avec un Ct=40 (triangle, Figure 2).

**L'exemple 3** montre la qPCR de la présente invention en format simplexe ou multiplexe permet la détection séparée ou simultanée de BCR-ABL et ABL1 avec une grande précision. La lignée LMC K562 positive pour BCR-ABL a été utilisée.

Les courbes standards (quantité d'ADNc de K562-vs-valeurs Ct) de la qPCR en format multiplexe pour ABL1 et BCR-ABL (Figures 3a & 3b) montrent des résultats suivant les normes internationales IVD (Efficacité = 92-101%, slope entre -3 et 3,9, et  $R^2 = 0,99$ ). Aussi une superposition parfaite des courbes des valeurs Ct pour ABL1 et BCR-ABL et cela en réaction simplexe et multiplexe a été aussi observée (Figures 4a & 4b).

## EXPERIENCES

### Exemple 1 : Protocole de qPCR de la présente invention pour la détection de BCR-ABL et ABL1

L'extraction de l'ARN cellulaire se fait avec RNeasy mini kit Qiagen suivant les recommandations du fournisseur Qiagen (Qiagen Inc). La qualité du test est dépendante de la qualité de l'ARN initiale. De ce fait, il est purifié sur électrophorèse en gel d'agarose ou sur Bioanalyzer (Agilent) avant l'analyse.

L'ADNc est obtenue à partir d'ARN total extrait d'échantillon test. La synthèse d'ADNc est réalisée à l'aide du Thermocycleur (Applied Biosystems) en utilisant le kit RNA to cDNA Reverse Transcription suivant les recommandations du fournisseur Applied Biosystems.

Le mastermix de la réaction qPCR contient les amorces et la sonde de BCR-ABL et les amorces et la sonde d'ABL1, 5µl ADDc et le tout est ajouté au Mastermix (TaqMan Fast Universal PCR Master mix : Applied Biosystems) pour un volume final de 25µl.

Pour la réaction en simplexe, seulement la sonde et les amorces pour BCR-ABL ou ABL1 sont utilisés dans différent puits de qPCR alors que pour la réaction en multiplexe, les sondes et les amorces pour BCR-ABL et ABL1 sont utilisés simultanément dans le même puits de qPCR.

Le cycle thermal de la qPCR est fait dans les conditions suivantes : étape 1 à 95C° pendant 20 secondes; étape 2 (cycle de 50) à 95C° pendant 1 seconde ; et une étape 3 à 60°C pendant 30 secondes.

Pour la courbe standard de la qPCR, des séries de 7-9 dilutions d'ADNc sont utilisées. Les concentrations sont 0,16 pg, 4pg, 20pg, 100pg, 500pg, 2,5ng, 12,5ng, et 25ng. Pour cette courbe standard, une valeur  $R^2 > 0,95$  est acceptée par contre une valeur  $R^2 < 0,95\%$  est refusée et la qPCR doit être répétée.



**Exemple 2 : La performance de l'essai qPCR pour détecter BCR-ABL dans la lignée leucémique K562 et dans un échantillon de sang de patient LMC ou du contrôle sain**

**Les séquences des amorces et de la sonde BCR-ABL utilisées en Figures 1a**

- Amorçe Forward : 5' Tccgctgaccatcaataagg 3' (SEQ ID N° 1)
- Amorçe reverse : 5'acctgaggctcaaagtcag 3' (SEQ ID N° 4)
- Sonde : 5' R-cccttcagcggccagtagca-Q 3' (SEQ ID N° 9)

*Pour la sonde : R= FAM et Q=BBQ*

**Les séquences des amorces et de la sonde BCR-ABL utilisées en Figure 1b**

- Amorçe Forward : 5' Actccagactgtccacagca 3' (SEQ ID N° 2)
- Amorçe reverse : 5'acctgaggctcaaagtcag 3' (SEQ ID N° 4)
- Sonde : 5' R-cccttcagcggccagtagca-Q 3' (SEQ ID N° 9)

*Pour la sonde : R= YY et Q=BHQ1*

**Les séquences des amorces de la sonde BCR-ABL utilisées en Figure 2**

- Amorçe Forward : 5' Actccagactgtccacagca 3' (SEQ ID N° 2)
- Amorçe reverse : 5'acctgaggctcaaagtcag 3' (SEQ ID N° 4)
- Sonde : 5' R-cccttcagcggccagtagca-Q 3' (SEQ ID N° 9)

*Pour la sonde : R= YY et Q=BHQ1*

**Exemple 3 : La performance de l'essai qPCR pour détecter BCR-ABL en format simplexe et duplexe en utilisant la lignée leucémique K562 positive pour BCR-ABL**

**Les séquences des amorces et de la sonde ABL1 utilisées en Figures 3a & 4a**

- Amorçe Forward : 5' ctgaccaactcgtgtgtgaa 3' (SEQ ID N° 5)
- Amorçe reverse : 5' ccctgaggctcaaagtcaga 3' (SEQ ID N° 7)
- Sonde : 5' R-cccttcagcggccagtagca-Q 3' (SEQ ID N° 10)

*Pour la sonde : R= JOE et Q=BBQ*

**Les séquences des amorces et de la sonde BCR-ABL utilisées en Figures 3b & 4b**

- Amorçe Forward : 5'Tccgctgaccatcaataagg 3' (SEQ ID N° 1)
- Amorçe reverse : 5'acctgaggctcaaagtcag 3' (SEQ ID N° 4)
- Sonde : 5' R-cccttcagcggccagtagca-Q 3' (SEQ ID N° 9)

*Pour la sonde : R= FAM et Q=BHQ1*

**LISTE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES**

SEQ ID N° 1 : F-BCR-ABL

Longueur : 20

Tccgctgaccatcaataagg (F3)

SEQ ID N° 2 : F- BCR-ABL

Longueur : 20

Actccagactgtccacagca (F4)

SEQ ID N° 3: R- BCR-ABL

Longueur : 20

Ccctgaggctcaaagtcaga (R1)

SEQ ID N° 4 : R- BCR-ABL

Longueur : 20

Accctgaggctcaaagtcag (R2)

SEQ ID NO° 5: F-ABL1

Gtggccagtggagataacac (F1)

SEQ ID N° 6 : F-ABL1

Longueur : 31

Tggagataacactctaagcataactaaaggt (F2)

SEQ ID N° 7: R-ABL1

Longueur : 20

Tgttgactggcgtgatgtag (R1)

SEQ ID N° 8: R-ABL1

Longueur: 21

Gatgtagttgctgggaccca (R2)

SEQ ID N°9 : S- BCR-ABL

Longueur : 20

Ccctcagcggccagtagca (P1)

SEQ ID N° 10 : S-ABL1

Longueur : 20

Aaatggccaaggctgggtcc (P1)

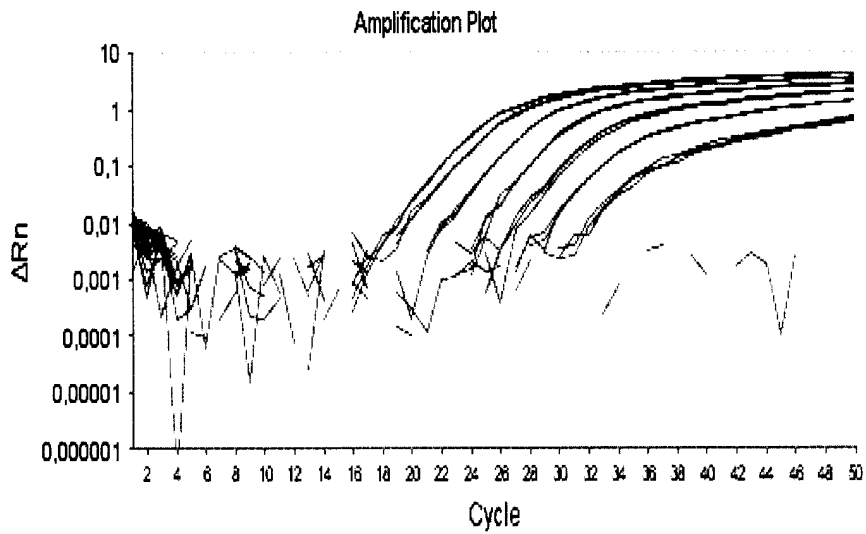
F = amorce forward

R = amorce reverse

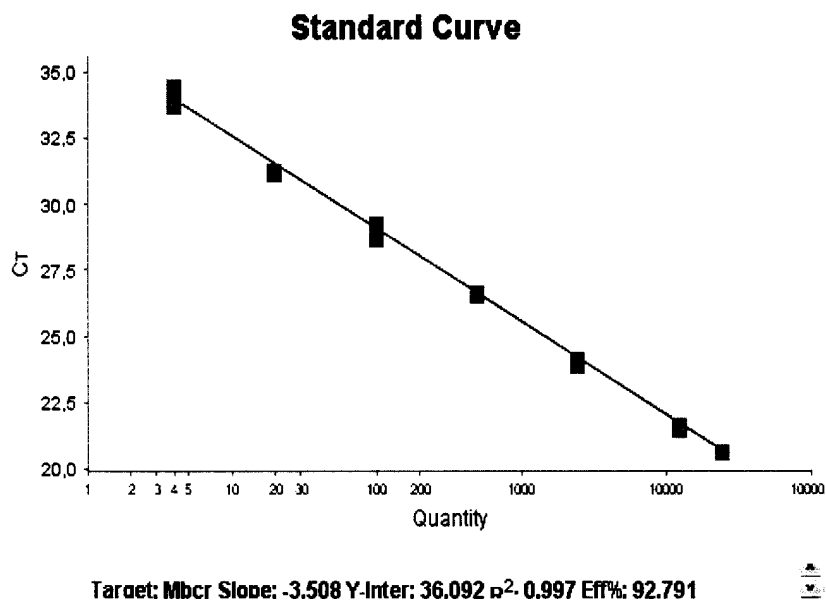
S = sonde

## REVENDEICATIONS

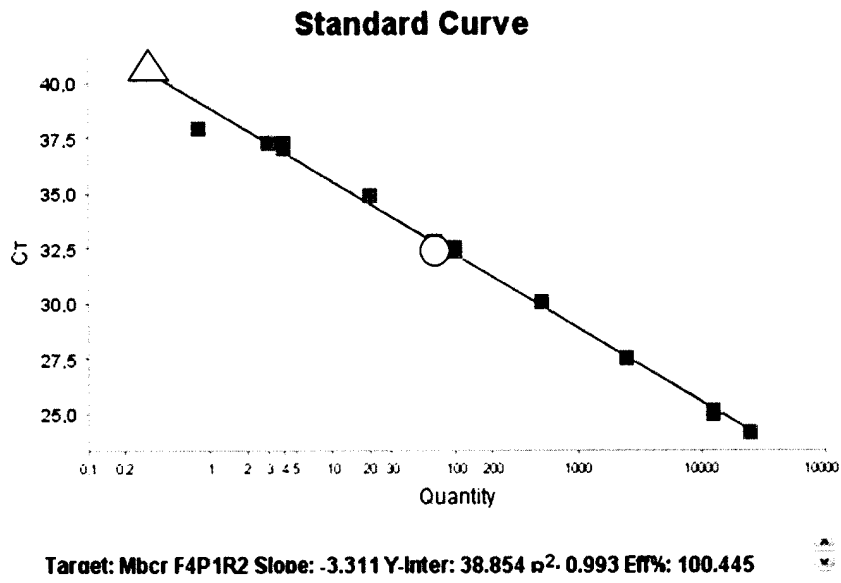
1. Une méthode pour la détection des gènes BCR-ABL (responsable de la LMC) et ABL1 dans un échantillon test, **caractérisée en ce que** la méthode comprend deux étapes :
  - a) mettre en contact l'échantillon test avec au moins une amorce au forward ayant des séquences sélectionnées parmi le group de séquences : SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, et au moins une amorce reverse sélectionnée parmi le group de séquences: SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7, SEQ ID N°8 ;  
et
  - b) mettre en contact l'échantillon test avec une sonde de détection sélectionnée parmi le group de séquences : SEQ ID N° 9 et SEQ ID N° 10.
2. Méthode selon la revendication 1, où deux amorces pour amplifier le gène BCR-ABL dans un échantillon test sont constituées d'une amorce forward ayant une séquence sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, et une amorce reverse sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 3, SEQ ID N°4,
3. Méthode selon la revendication 1, où une sonde pour la détection du gène BCR-ABL dans un échantillon test, a une séquence SEQ ID N°9.
4. Méthode selon la revendication 1, où deux amorces pour amplifier le gène ABL1 dans un échantillon test sont constituées d'une amorce forward ayant une séquence sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, et une amorce reverse sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 7, SEQ ID N°8.
5. Méthode selon la revendication 1, où une sonde pour la détection du gène ABL1 dans un échantillon test, a une séquence SEQ ID N°10.
6. Méthode selon les revendications 1 à 5, où Les sondes pour détecter



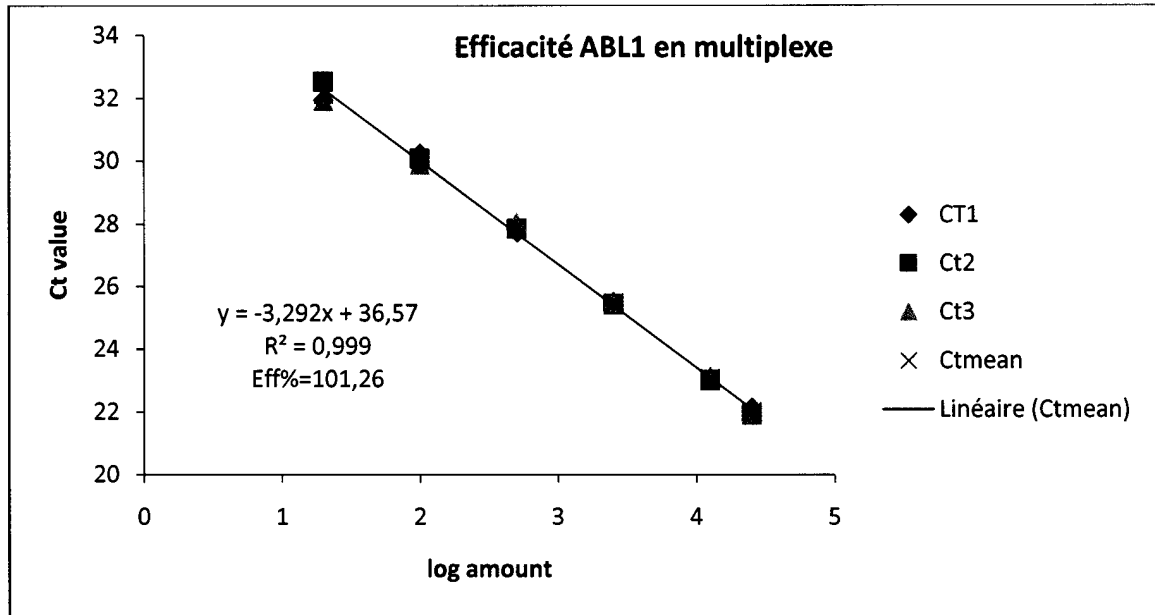
**Figure 1a**



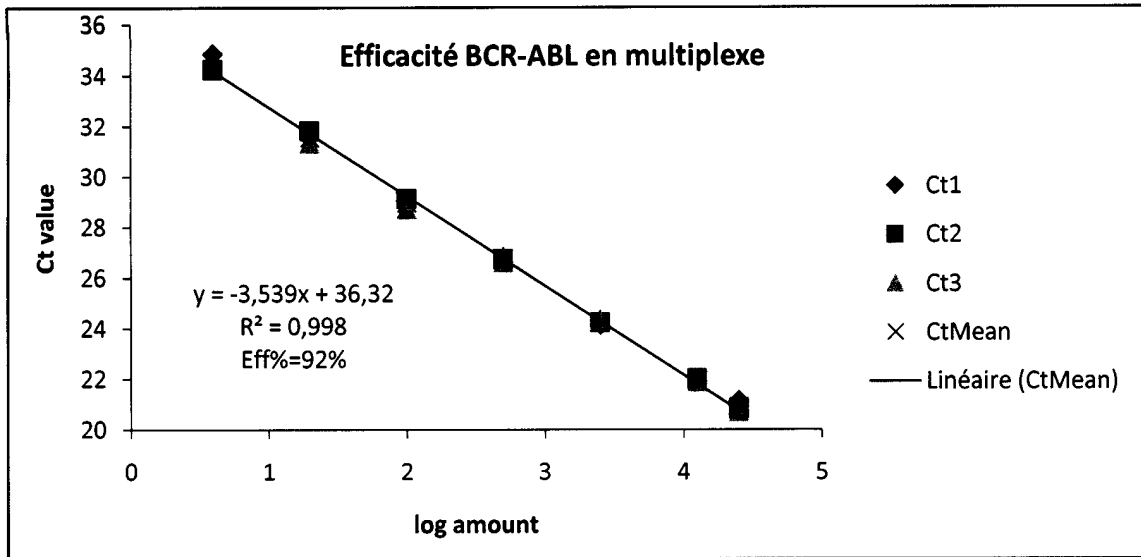
**Figure 1b**



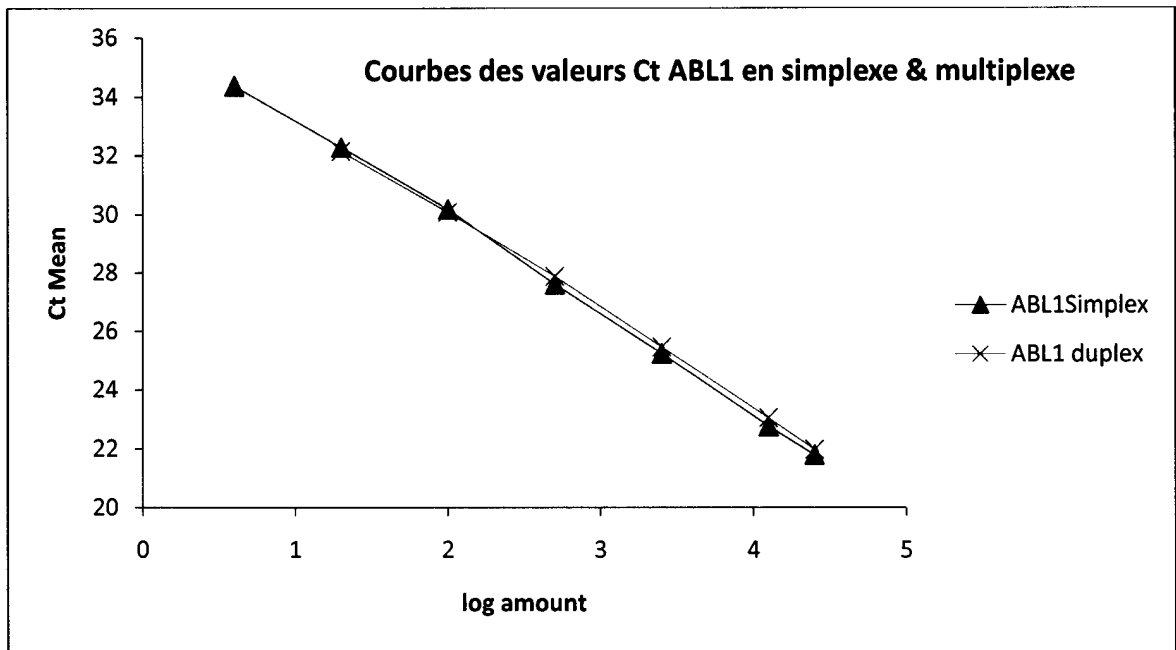
**Figure 2**



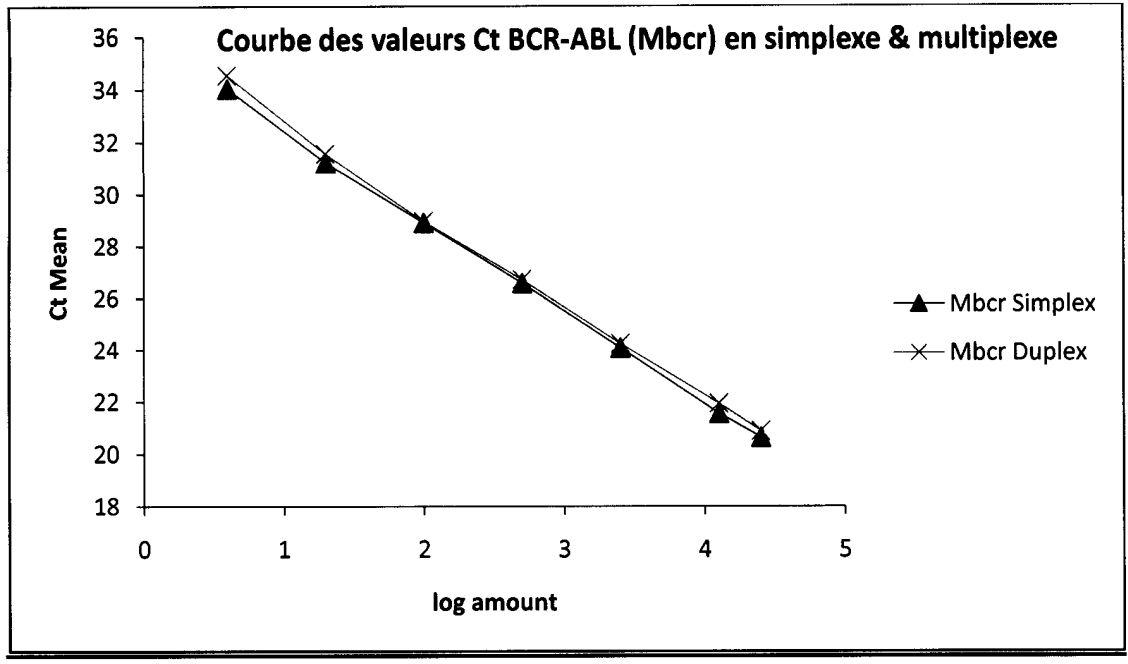
**Figure 3a**



**Figure 3b**



**Figure 4a**



**Figure 4b**