



(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 35294 B1** (51) Cl. internationale : **C12Q 00/00**

(43) Date de publication :
01.08.2014

(21) N° Dépôt :
35508

(22) Date de Dépôt :
27.12.2012

(71) Demandeur(s) :
MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED ELJAZOULI, MADINAT ALIRFANE RABAT 10100 (MA)

(72) Inventeur(s) :
El hassane Sefrioui ; Denise Kottwitz ; Manale El amrani ; Abdeladim Moumen ; Nadia Bouchoutrouch

(74) Mandataire :
ABDELHAQ AMMANI

(54) Titre : **SONDES ET AMORCES POUR DETECTER LE GENE HER2 EN FORMAT MULTIPLEXE ET SES APPLICATIONS DANS LE CHOIX DU TRAITEMENT DU CANCER DE SEIN HER2**

(57) Abrégé : L'invention concerne le domaine du diagnostique du cancer du sein HER2. Plus précisément, l'invention divulgue une méthode utilisant de nouveaux sondes et amorces pour détecter le gène HER2 en format multiplexe et ses applications dans le choix de traitement du cancer du sein. Le protocole de la méthode utilise la PCR quantitative en temps réel (qPCR) sous un format simplexe ou multiplexe. Les gènes contrôles sélectionnés dans la présente convention (RPL30, RPLP37, et MRPL19) appartiennent à la famille des gènes codants pour des protéines ribosomales et sont décrits ici pour la première fois dans la quantification de HER2.

35294
01 AOUT 2014

**Sondes et amorces pour détecter le gène HER2 en format multiplexe et ses applications
dans le choix de traitement du cancer de sein HER2**

Abrégé :

L'invention concerne le domaine du diagnostique du cancer du sein HER2. Plus précisément, l'invention divulgue une méthode utilisant de nouveaux sondes et amorces pour détecter le gène HER2 en format multiplexe et ses applications dans le choix de traitement du cancer du sein. Le protocole de la méthode utilise la PCR quantitative en temps réel (qPCR) sous un format simplexe ou multiplexe. Les gènes contrôles sélectionnés dans la présente convention (RPL30, RPLP37, et MRPL19) appartiennent à la famille des gènes codants pour des protéines ribosomales et sont décrits ici pour la première fois dans la quantification de HER2.

**Sondes et amorces pour détecter le gène HER2 en format multiplexe et ses applications
dans le choix de traitement du cancer de sein HER2**

DOMAINE TECHNIQUE

L'invention préconise de nouvelles sondes, amorces, sets de sondes, sets d'amorces, sets de sondes et amorces pour détecter et quantifier l'expression du gène HER2 et un gène contrôle normalisateur en utilisant la PCR quantitative en temps réel (qPCR) sous un format simplexe ou multiplexe. Les gènes contrôles sélectionnés dans la présente convention (RPL30, RPLP37, et MRPL19) appartiennent à la famille des gènes codants pour des protéines ribosomales et sont décrits ici pour la première fois dans la quantification de HER2.

En accord avec cette invention, la quantification de l'expression du gène HER2 et le gène contrôle par qPCR permettra de sélectionner les patients cancéreux, surexprimant le gène HER2 et candidats pour le traitement avec l'anticorps anti-HER2 (Herceptin®).

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Il est aussi le cancer le plus répandu des cancers de la femme. Au Maroc, le cancer du sein frappe plus de 15 000 femmes chaque année (registre des cancers Région Casablanca, 2004, édition 2007).

Le gène HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) se trouve sur le chromosome 17 et code pour le récepteur de facteur de croissance HER2, une protéine transmembranaire ayant une activité tyrosine kinase et étant surexprimée dans 30% des cancers de sein. La surexpression de HER2 induit une amplification génique et son activation induit la prolifération des cellules tumorales, la stimulation de l'angiogénèse et la métastase.

L'Herceptin® est un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement le domaine extramembranaire de la protéine HER2 (ECD) et inhibe ainsi l'activité tumorale de cette dernière. Plusieurs essais cliniques randomisés ont démontré un bénéfice en survie globale de l'Herceptin® en combinaison avec la chimiothérapie chez les patientes atteints par un du

cancer de sein surexprimant HER2 (Romond EH ; *N Engl J Med.* 2005; 353:1673–684. Gianni L ; *Lancet Oncol* ; 2011;12:236–244]. D’autres essais cliniques ont montré la même efficacité de l’Herceptin® dans le cas du cancer de l’estomac ou de l’œsophage surexprimant HER2 (Bang YJ ; *Lancet.* 2010; 16;376(9749):1302)

La méthode standard actuelle permettant de quantifier relativement l’expression de HER2 d’une tumeur est l’immunohistochimie (IHC). Le but de l’IHC est de mettre en évidence une surexpression de la protéine HER2, qui se caractérise par un score HER2 (3+), lequel indique un traitement par l’Herceptin® (Genentech, San Francisco, Calif.). L’Herceptin® est un anticorps qui détecte la protéine HER2 au niveau de la membrane cellulaire. La technique de FISH (fluorescence in situ hybridization) est utilisée dans les situations de scores intermédiaires (Her2 (2+)). La FISH permet de visualiser directement l’amplification du gène HER2 en utilisant des sondes ADN fluorescentes. Cependant, l’IHC et la FISH manquent surtout d’essais quantitatifs et qualitatifs, elles sont moins spécifiques, utilisent des anticorps ou des hybridations complexes, prennent énormément de temps (plusieurs jours), le score final nécessite plusieurs examinateurs, en plus la méthode FISH est très coûteuse.

C’est pour les raisons citées ci-dessus qu’il est préférable d’identifier des méthodes de quantification de HER2 avec plus de sensibilité et de fiabilité, de meilleures reproductibilités quantitatives et qualitatives et avec un coût plus bas.

Actuellement, la PCR en temps réel (qPCR) qui consiste en une amplification du gène cible a été appliquée avec succès en diagnostics cliniques (Hughes TP ; *N Engl J Med.* 2003;349:1423-1432) en raison de sa haute spécificité, de sa rapidité, de sa fiabilité et de son faible coût.

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 permettra la quantification exacte du gène cible. Dans le cas de la quantification de HER2, plusieurs gènes contrôles ont été utilisés en littérature comme GAPDH (Bofin A, *Am J Clin Pathol* 2004;122:110-119) et beta-actine (Kao J, *PLoS ONE* 2009 ; 4 ; e6146)). La liste des gènes contrôles humains sont cités par Eisenberg et al (*Trends in Genetics* 2003 ; 19 : 362-365).

Cependant, l'utilisation d'un gène contrôle dont l'expression n'est pas stable entre les différents échantillons analysés affecte la validité des résultats. C'est pour cette raison, il faut tester plusieurs gènes contrôles et choisir le plus stable. Dans le cas de la présente invention, 3 gènes contrôles stables ont été sélectionnés après être validés et confirmés simultanément par 2 différents logiciels statistiques internationaux Genorm et GenFinder.

EXPOSE DE L'INVENTION

L'invention concerne l'utilisation d'un ensemble de sondes et d'amorces nouveaux et d'une méthode de qPCR en condition simplexe ou multiplexe pour la détection et la quantification des transcrits du gène HER2 qui permet ainsi le diagnostic et le choix ou non de l'Herceptin® comme traitement de base au cancer de sein et/ou tout autre cancer surexprimant HER2.

Le procédé de la présente invention représente une amélioration des autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet a) de gagner en fiabilité et reproductibilité en utilisant des gènes contrôles normalisateurs plus stables b) de gagner en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces plus spécifiques et plus sensibles c) une réduction du coût de consommables et du temps de réalisation du fait que l'amplification des transcrits du gène HER2 et du gène contrôle se font simultanément dans le même puits de qPCR.

Selon la présente invention, la détection et la quantification des transcrits des gènes cibles se font par la méthode qPCR en différentes étapes a) concevoir et synthétiser des nouvelles séquences nucléotidique de sondes et amorces qui s'hybrident spécifiquement sur les transcrits du gène HER2 ou le gène contrôle b) le gène contrôle est sélectionné parmi le group RPL30, MRPL19, RPLP37, et tout autres gènes contrôles codant pour des protéines ribosomales c) quantification du nombre de copies du gène HER2 sur le chromosome 17 d) quantification du nombre de copies du gène contrôle e) comparaison du nombre de copie de gène HER2 à celui du gène contrôle en obtenant un rapport de nombre de copie entre le gène HER2 et le gène contrôle (f) l'évolution de ce rapport entre patients de cancer avec des scores d'IHC de 3+, 2+ ou 0 permet de déterminer un seuil minimum de détection et une identification de patients candidats pour un traitement à l'Herceptin®.

Selon une caractéristique de l'invention, a) les amorces permettant la détection du transcrite HER2 dans un test échantillon ont des séquences d'oligonucléotides 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 transcrite du gène contrôle RLP30 par exemple 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, SEQ ID NO : 8.

Selon une autre caractéristique de la présente invention,

a) la sonde pour détecter le transcrite du gène HER2 dans un test échantillon a une séquence sélectionnée parmi: SEQ ID : 9, SEQ ID : 12.

b) la sonde pour détecter le transcrite du gène contrôle RLP30 dans un test échantillon a une séquence sélectionnée parmi SEQ ID : 10, SEQ ID : 11.

En accord avec cette invention, l'ensemble des amorces qui amplifient les transcrits du gène HER2 ou RLP30 dans un test échantillon inclus :

a) pour HER2, une amorce «forward» ayant une séquence sélectionnée parmi le groupe : SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3, et une amorce «reverse» ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4

b) pour RLP30 par exemple, une amorce «forward» ayant une séquence parmi le groupe : SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 7, et une amorce «reverse» ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8.

La présente invention concerne aussi une méthode pour la détection des transcrits des gènes HER2 et RLP30 dans un même test échantillon. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes :

a) Pour HER2, mettre en contact un test échantillon avec une amorce «forward» ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 3, et une amorce «reverse» sélectionnée parmi SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4 dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible.

b) Pour RLP30, mettre en contact un test échantillon avec une amorce «forward» ayant une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 7, et une amorce

reverse sélectionnée parmi SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 8 dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible

c) Détecter l'amplification des deux séquences cibles, HER2 et RPL30, dans un même test échantillon avec deux sondes différentes. Pour HER2, la sonde a une séquence sélectionnée parmi SEQ ID° : 12 et SEQ ID NO : 9 et pour RPL30, la sonde a une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 10 et SEQ ID NO : 11.

Selon la méthode de la présente invention, l'amplification d'un gène consiste à mettre le test échantillon dans une réaction d'amplification en présence de réactifs d'amplification. La réaction d'amplification peut être une PCR, RT-PCR ou qPCR.

En accordance avec la présente invention, une sonde contient une unité fluorescente (reporter) attachée à la région 5' d'ADN. En plus, 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 (HER2 ou RLP30).

En accordance aussi avec cette invention, l'amplification des transcrits des gènes HER2 et RLP30 par la qPCR de la présente invention peuvent se faire en format simplexe ou multiplexe.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Graphique représentant les cycles de la PCR en fonction du Delta Rn pour les transcrits du gène HER2. La lignée cellulaire du cancer de sein positive pour HER2 (SKBR3) est utilisée comme source du matériel génétique subissant une qPCR de la présente invention. 7 concentrations d'ADNc (ADN résultant de la transcription inverse de l'ensemble des ARNm du SKBR3) (4pg-25ng) ont été utilisées.

Figure 2 : Courbe standard (Cycle threshold (Ct)-versus-log quantité ADNc) reconstituée par les résultats obtenus en Figure 1.

Tableau 1 : Valeurs Ct utilisées dans la courbe standard présentée dans la Figure 2.

Figure 3 : Courbe représentant les cycles de la PCR en fonction du Delta Rn pour les transcrits du gène HER2. Deux échantillons de patientes de cancer de sein (score 3+) et 2 autres avec un score négatif (0) ont été testés en utilisant la qPCR de la présente invention.

Figure 4: Courbe des valeurs Ct de la qPCR de la présente invention chez des patientes de cancer de sein avec un score de 3+ (n=2), 2+ (n=2) ou un score négatif (0) (n=4).

Figure 5 : Courbes des gènes contrôles les plus stables et les moins stables dans les biopsies de patientes de cancer de sein HER2. L'expression de plusieurs gènes contrôles a été quantifiée par la qPCR de la présente invention.

EXPOSE DETAILLE

L'invention préconise des sondes, amorces, ensemble d'amorces, ensemble de sondes et amorces qui peuvent être utilisés pour amplifier, détecter et quantifier le gène HER2 ou le gène contrôle dans un échantillon test.

L'invention préconise aussi une méthode de détection des transcrits du gène HER2 et du gène contrôle RPL30 dans un échantillon test en utilisant les ensembles d'amorces et sondes cités ci-dessus. Les ensembles d'amorces et sondes de la présente invention permettent une meilleure sensibilité et spécificité pour détecter HER2 et RPL30.

Selon une caractéristique de la présente invention, l'amplification des transcrits du gène HER2 et du gène contrôle se fait au moins en qPCR en format simplexe ou multiplexe permettant ainsi une meilleure quantification de HER2 et un gain en temps et en coût.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la quantification plus sensible et plus spécifique de HER2 permettra de sélectionner les patientes candidates pour un traitement à l'Herceptin®.

Le mot 'HER2' décrit dans la présente invention, représente le gène 'human epidermal growth factor 2' qui code pour la protéine HER2, une thyrosine kinase qui peut induire la métastase et la prolifération tumorale, en cas de surexpression.

La détection et la quantification du transcrit du gène HER2 peut supporter le diagnostic et sélectionner les candidates pour le traitement à l'Herceptin®.

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

Le mot 'oligonucléotide' est une séquence composée d'ADN ou d'ARN ou leur combinaison avec une longueur qui vari de 10 à 70 nucléotides. Les oligonucléotides peuvent être synthétisés par plusieurs 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).

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

Le mot 'transcription inverse' citée ici représente une méthode permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de molécule d'ARN. L'ADNc sera utilisée dans la méthode PCR, RT-PCR ou qPCR.

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

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

Le mot 'PCR' (polymerase chain reaction) comme utilisée dans la présente invention réfère à une méthode dont un échantillon d'ADNc ou d'ADN est ajouté dans une solution en présence de nucléotides non attachés (exemple les dNTPs), 2 oligonucleotides amorces (forward et reverse); et de l'enzyme ADN polymérase (préférentiellement la Taq polymérase résistant à la chaleur) qui permet la catalyse la formation d'ADN à partir des 2 amorces et dNTPs. La solution mixe 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) utilisé dans 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) décrit dans la présente invention représente une méthode de PCR permettant l'étude des produits de la réaction PCR pendant les premières étapes d'amplification de l'ADN. La détection des produits de PCR se fait par des sondes marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Dans ce cas, l'intensité du signal de la fluorescence mesurée au cours la réaction d'amplification est proportionnelle au nombre de produits nouvellement formés (amplicons). La mesure en ADN ou ADNc se fait en logarithme. Pour quantifier un échantillon par qPCR et/ou déterminer la positivité d'une PCR, 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 molecular beacons et TaqMan 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, la présente invention, la qPCR de la présente invention utilise les sondes TaqMan et l'analyse d'amplification est faite par ABI PRISM 7900HT 'sequence detection system' qui est un système de screening pouvant détecter et quantifier des acides nucléiques. La quantité de HER2 et du gène contrôle est calculée par le logiciel intégré dans le système ABI PRISM 7900HT en utilisant la méthode de la courbe standard. Selon la présente invention, le reporteur de la sonde peut être FAM, JOE, YAKYE (YY) et le quencher BBQ, BHQ1, ou TAMRA.

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

Le mot 'gène contrôle' ou 'housekeeping gene' décrit dans la présente invention représente un gène exprimé en général de façon similaire par toutes les cellules d'un organisme. Parmi les gènes contrôles cités en littérature, on trouve la beta-actine, glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ABL1 et autres.

Le mot multiplexe cité dans la présente invention réfère à un essai qui se déroule simultanément avec au moins un autre essai. La qPCR en multiplexe préconise une détection du nombre de copies d'au moins 2 gènes dans un même tube de réaction. Selon la présente invention, les 2 gènes HER2 et RPL30 peuvent être détectés simultanément par qPCR.

Le mot 'échantillon test' comme décrit dans la présente invention réfère à un échantillon de biopsie tumoral fraîche ou paraffinée, cellules primaires, lignées cellulaires, salive ou autre fluides organiques exprimant ou surexprimants HER2. En accord avec la présente invention, l'échantillon test peut être d'origine humaine ou animal exprimant ou surexprimant le gène HER2 qui peut être amplifié en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

La méthode de qPCR citée dans la présente invention permet de déterminer le nombre de copies du gène HER2 dans un échantillon test en quantifiant le nombre de copies de HER2 relative à un gène contrôle. Le gène contrôle est sélectionné parmi les gènes RLP30, RP37, MPRL19 et tout gène contrôle codant pour des protéines ribosomales.

L'exemple 1 représente une description du protocole utilisé dans la méthode qPCR de la présente invention. Les étapes d'extraction d'ARN, de synthèse d'ADNc et de qPCR sont décrites dans ce protocole.

L'exemple 2 décrit la haute sensibilité et spécificité de la qPCR de la présente invention pour détecter les transcrits du gène HER2 au niveau de la lignée humaine de cancer de sein SKBR3 surexprimant HER2.

Les résultats de la qPCR de la présente invention sont montrés en Figure 1 (courbe d'amplification : cycle-vs-Delta Rn), Figure 2 (courbe standard : quantité d'ADNc de SKBR3-vs-valeurs Ct) et Tableau 1 (valeur de Ct correspondants à la courbe standard). Les valeurs de qualité obtenus sont suivant les normes IVD internationales ($R^2 > 0,95$, slope entre -3,0 et 3,9 et efficacité de 90-112)) avec une courbe standard à slope de -3.08, un R^2 de 0.98 et une efficacité de 111 (Figure 2). La courbe d'amplification (Figure 1) montre aussi une allure parfaite.

L'exemple 3 montre la courbe d'amplification (cycle-vs-Delta Rn) de la qPCR de la présente invention pour détecter le transcrit du gène HER2 chez des patientes de cancer de sein sur-exprimant HER2 (score 3+) (courbe vert) ou exprimant normalement HER2 (score 0) (courbe bleu) (Figure 3). Les patientes avec le score 3+ montrent bien une faible valeur Ct et donc une quantité plus élevée de HER2 comparée au patientes avec score 0 (Figure 3).

L'exemple 4 montre les valeurs de Ct (en triplicata) de la qPCR de la présente invention chez des patientes de cancer de sein avec un score de 3+, 2+ ou 0 (Figure 4). Les valeurs des Ct de la présente qPCR correspondent bien aux valeurs de l'IHC. En effet, pour le score de 3+, les valeurs des Ct sont plus basses (31-33,5). Dans le cas des patientes avec score négatif, les valeurs de Ct sont comprises entre 34 et 38. Alors la lignée SKBR3 surexprimant HER2 a une valeur Ct de 27,2 plus proche au 3+.

L'exemple 5 montre la courbe des gènes contrôles les plus stables (Figure 5). La mesure de la stabilité de l'expression de plusieurs gènes contrôles par qPCR sur des biopsies de patientes de cancer de sein HER2 a été validée en utilisant le logiciel Genorm. Les gènes contrôles RPL30, RPL37 et MRPL19 se trouvent tous à droite de la courbe dans la partie des gènes les plus stables (Figure 5). Les mêmes gènes contrôles ont été identifiés aussi comme les plus stables dans les lignées cellulaires de cancer de sein (SKBR3, MCF7, MDA) en utilisant le même logiciel Genorm (résultats ne sont pas montrés).

EXPERIENCES

Exemple 1 : Protocole de qPCR de la présente invention pour la quantification de HER2 au niveau de la lignée cellulaire SKBR3 surexprimant HER2 ou des biopsies paraffinées de cancer de sein

Le RNeasy mini kit du Qiagen a été utilisé pour extraire l'ARN cellulaire de SKBR3 selon les recommandations du fournisseur (Qiagen Inc). Alors que l'extraction de l'ARN à partir des échantillons de biopsies de patientes de cancer de sein a été faite par le kit Qiagen (QiagenRNeasy FFPE extraction kit) ou celui d'AMSBIO (England) suivant les recommandations des fournisseurs. La qualité et la pureté de l'ARN obtenue est testée par électrophorèse sur gel d'agarose, ou par le Bioanalyzer (Agilent).

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu 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 selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystems).

Les amorces et la sonde des gènes cibles et 5µl d'ADNc sont ajoutés au mastermix de la réaction qPCR (TaqMan Fast Universal PCR Master mix : Applied Biosystems) pour un volume final de 25µl.

Dans le cas de la réaction en format simplexe, seulement la sonde et les amorces de HER2 ou gène contrôle sont utilisés dans différents puits de qPCR alors que pour la réaction en

format multiplexe, les sondes et les amorces pour HER2 et le gène contrôle sont utilisés simultanément dans le même puits de réaction qPCR.

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

Dans le cas de la courbe standard de la qPCR de la présente invention, des séries de dilutions d'ADNc sont utilisées. Les concentrations utilisées sont 4pg, 20pg, 100pg, 500pg, 2,5ng, 12,5ng, et 25ng. Pour cette courbe standard, et comme les réglementations international, une valeur $R^2 > 0,95$ est acceptée par contre une valeur $R^2 < 0,95$ est refusée et la qPCR doit être répétée.

Exemples 2, 3, 4 : La performance de qPCR de la présente invention pour quantifier HER2 dans la lignée de cancer de sein SKBR3 et chez les patients de cancer de sein HER2 (courbe d'amplification, courbe standard et les valeurs de Ct)

Les séquences des amorces et de la sonde HER2 utilisées en **Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4 et Tableau 1** :

- Amorce Forward : 5' Aatgccaggcactgtttg (SEQ ID N° 1)
- Amorce reverse : 5' Gtccttatagtgggcacagg 3' (SEQ ID N° 2)
- Sonde : 5' R- Gtccttatagtgggcacagg-Q 3' (SEQ ID N°. 9)

Pour la sonde : R= YY et Q=BHQ1

LISTE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

SEQ ID N° 1 : F-HER2

Longueur : 18

Aatgccaggcactgtttg (F9)

SEQ ID N° 2: R- HER2

Longueur : 20

Gtccttatagtgggcacagg (R6)

SEQ ID N° 3: F-HER2

Longueur : 20

Taccgacggagaatctggta (F4)

SEQ ID N° 4: R-HER2

Longueur; 20

Actcgatggacctctacac (R14)

SEQ ID N° 5: F-RPL30

Longueur: 20

Tggctatcattgatccaggt (F1)

SEQ ID N° 6 : R-RPL30

Longueur : 20

Tttgcaggtttaaggtttgc (R1)

SEQ ID N° 7 : F-RPL30

Longueur: 20

Ggctatcattgatccaggtg (F2)

SEQ ID N° 8 : R-RPL30

Longueur: 20

Ggtttaaggtttgcaggtga (R2)

SEQ ID N°9 : S- HER2

Longueur : 20

Ccgtgccaccctgagtgca

SEQ ID N° 10 : S-RPL30

Longueur : 23

Ttcaccagtctgttctggcatgc

SEQ ID N° 11: S-RPL30

Longueur: 23

Tcagatttctcaaagctgggca

SEQ ID N°12

Longueur : 20

Gacccgagggtcctggacga

F = amorce forward

R = amorce reverse

S = sonde

REVENDEICATIONS :

1. Une méthode pour la détection et la quantification du gène et/ou du transcrit du gène HER2 et du gène contrôle spécifique dans un échantillon test, **caractérisée en ce que** la méthode comprend au moins l'une des deux étapes suivantes :
 - a) Mise en contact de l'échantillon test avec au moins une amorce «forward» ayant des séquences sélectionnées parmi le group de séquences : SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, et au moins une amorce «reverse» sélectionnée parmi le group de séquences: SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N°8.
 - b) Mise en contact l'échantillon test avec au moins une sonde de détection sélectionnée parmi le group de séquences : SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, et SEQ ID° 11.
2. Méthode selon la revendication 1, où deux amorces pour amplifier le transcrit du gène HER2 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° 3, et une amorce «reverse» sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 2, SEQ ID N°4.
3. Méthode selon la revendication 1, où une sonde pour la détection du transcrit du gène HER2 dans un échantillon test, a une séquence SEQ ID N°9.
4. Méthode selon la revendication 1, où deux amorces pour amplifier le transcrit du gène RPL30 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° 7, et une amorce «reverse» sélectionnée parmi le groupe de séquences : SEQ ID N° 6, SEQ ID N°8.

5. Méthode selon la revendication 1, où une sonde pour la détection le transcrit du gène RPL30 dans un échantillon test, a une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID N°10, SEQ ID N°11.
6. Méthode selon la revendication 1, où le gène contrôle (housekeeping gene) est sélectionné parmi le groupe des gènes RPL30, RPLP37, MRPL19 et tout autre gène contrôle codant pour des protéines de la sous unité ribosomale 60S.
7. Méthode selon les revendications 1 à 6, où Les sondes pour détecter le transcrit des gènes HER2 ou RPL30 en qPCR sont attachées à des entités fluorescentes (reporters) et des inhibiteurs de fluorescence (quenchers). Le reporteur peut être FAM, JOE ou YY ou similaires, attaché à l'extrémité 5' et l'inhibiteur de fluorescence (quencher) peut être BBQ, BHQ1, ou TAMRA ou similaires attaché à l'extrémité 3'.
8. Méthode selon les revendications 1 à 7, où la détection des transcrits des gènes HER2 et du gène contrôle d'un échantillon test est effectuée de façon séparée (format simplexe) ou simultanée dans un même puits de qPCR (format multiplexe).
9. Méthode selon les revendications 1 à 8, où le degré d'expression est mesuré à l'échelle d'ARNm
10. Méthode selon les revendications 1 à 9, où l'utilisation de ladite méthode comprend au moins une des techniques PCR, PCR en temps réel (qPCR) ou transcription inverse PCR (RT-PCR).

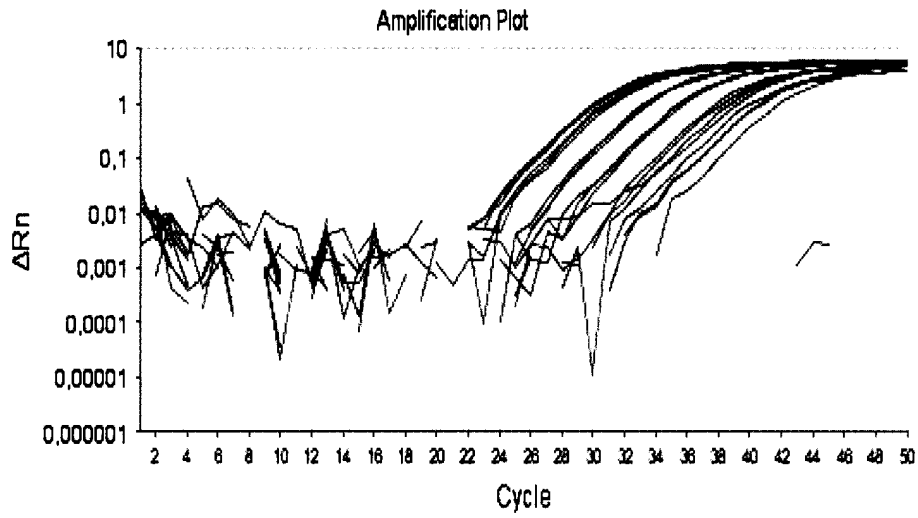
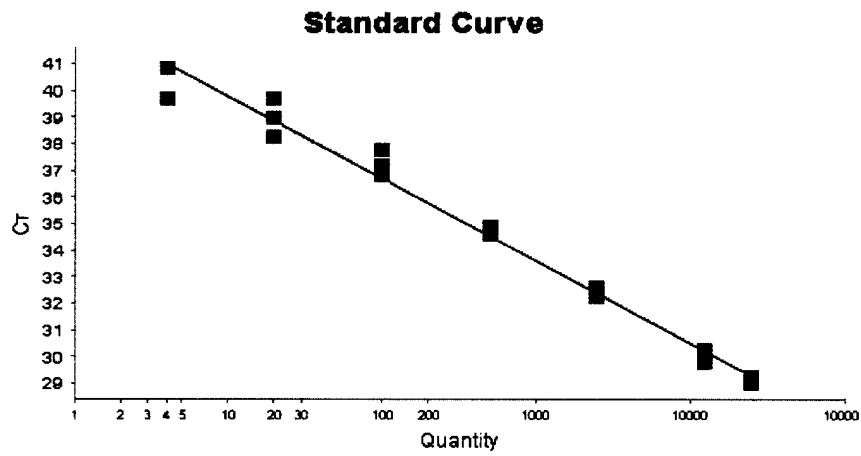


Figure 1.



Target: SKBR3 F9 P1 R6 Slope: -3.079 Y-Inter: 42.838 R^2 : 0.984 Eff%: 111.217

Figure 2.

Name	Final amount/Reaction	Ct1	Ct2	Ct3	Ct Mean	CV %
S7	4 pg	Und.	39,660	40,787	40,223	1,98122801
S6	20 pg	38,218	39,649	38,966	38,944	1,83788516
S5	100 pg	36,808	37,153	37,762	37,241	1,29709107
S4	0,5 ng	34,563	34,577	34,872	34,671	0,50330316
S3	2,5 ng	32,584	32,270	32,390	32,414	0,48882158
S2	12,5 ng	29,790	29,952	30,291	30,011	0,85188089
S1	25 ng	29,251	29,204	29,984	29,149	1,50055654
Neg	0 pg	Und.				

Tableau 1

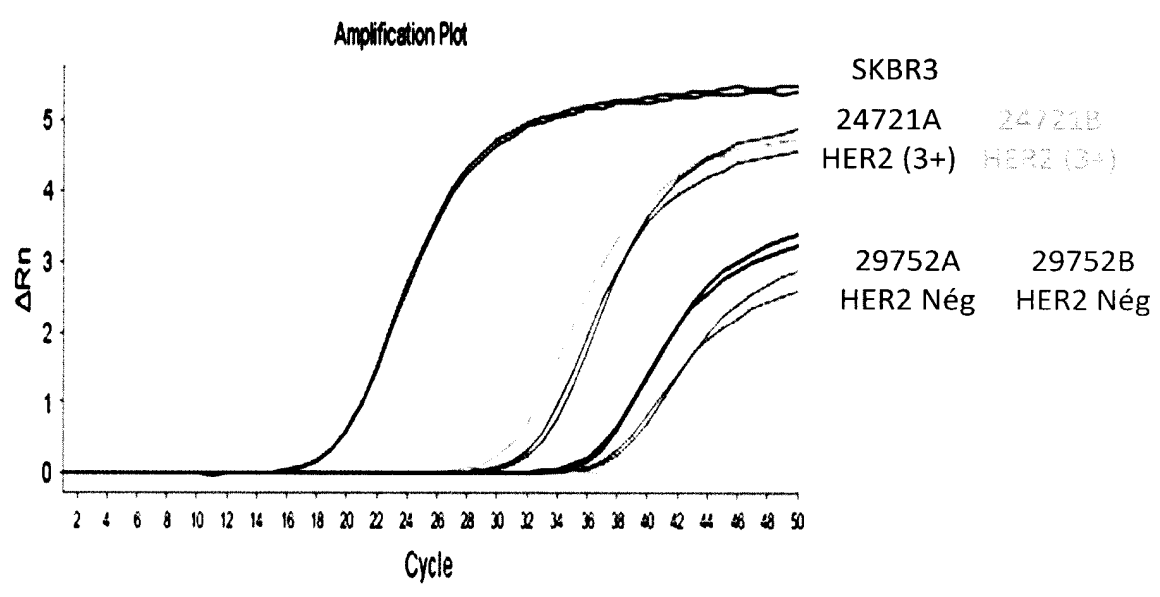


Figure 3.

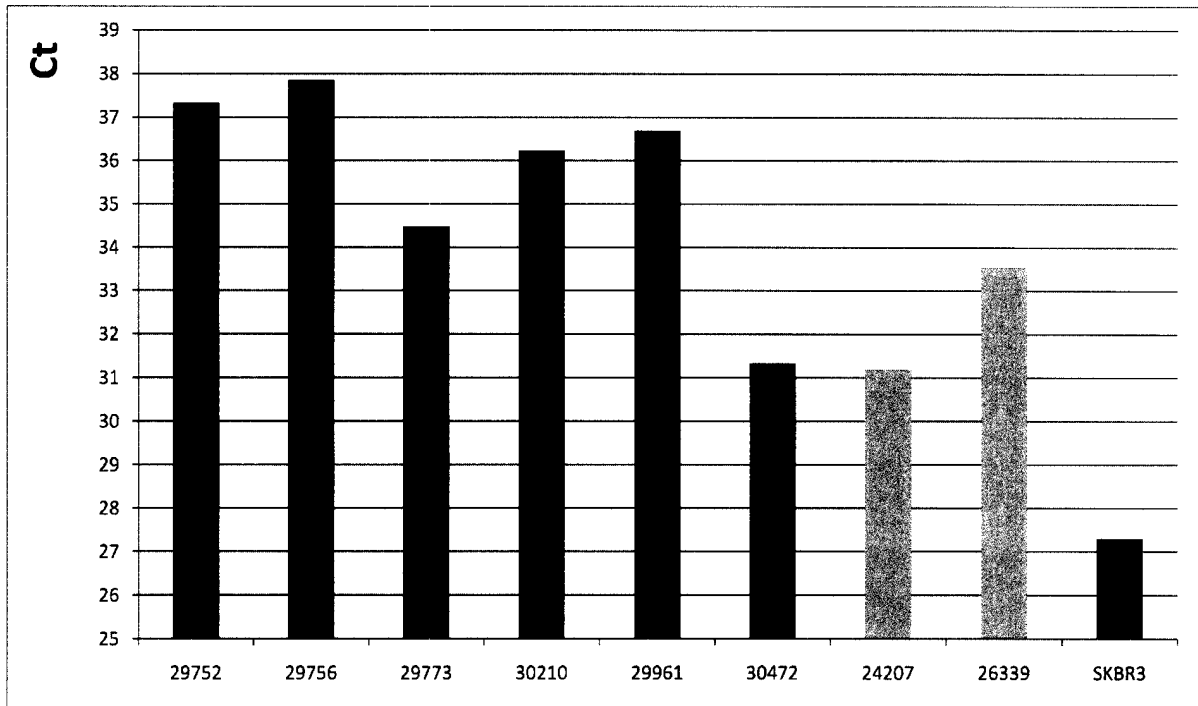
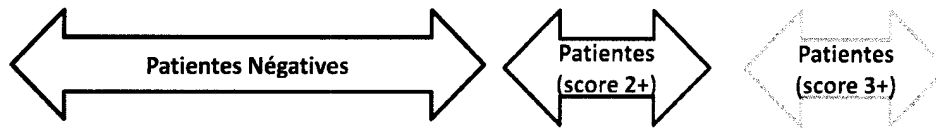


Figure 4.

Average expression stability values of remaining control genes

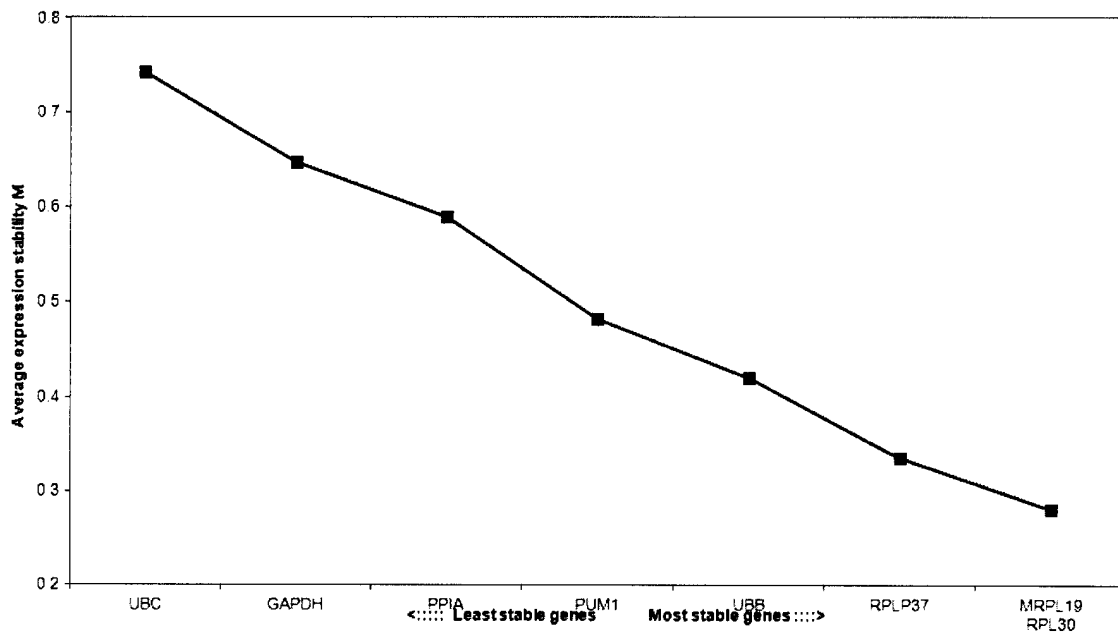


Figure 5.