



## (12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 38741 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/68**  
(43) Date de publication : **31.07.2017**

- 
- (21) N° Dépôt : **38741**  
(22) Date de Dépôt : **29.12.2015**  
(71) Demandeur(s) : **MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED ELJAZOULI, MADINAT ALIRFANE, RABAT, 10100 RABAT 10100 (MA)**  
(72) Inventeur(s) : **Ait Benhassou Hassan ; SEFRIQUI EI Hassane ; MOUMEN Abdeladim ; QMICHOU Zineb ; EL HADI Hicham ; Abdellaoui-Maane Iman**  
(74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

- 
- (54) Titre : **Amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du génome du virus de l'hépatite C**  
(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine des maladies virales. Elle concerne en particulier l'amplification, la détection et/ou de la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type C(VHC) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'un ou de plusieurs nouveaux sets d'amorces et de sondes. Cette invention peut aussi s'appliquer lorsque les séquences d'acides nucléiques du VHC présentent une variabilité, et ce pour autant de séquences qu'elles possèdent et permettant l'hybridation avec les sets d'amorces et de sondes utilisées.

**Amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du génome du virus de l'hépatite C.**

5

**Abrégé :**

La présente invention concerne le domaine des maladies virales. Elle concerne en particulier l'amplification, la détection et/ou de la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type C (VHC) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'un ou de plusieurs nouveaux sets d'amorces et de sondes. Cette invention peut aussi s'appliquer lorsque les séquences d'acides nucléiques du VHC présentent une variabilité, et ce pour autant de séquences qu'elles possèdent et permettant l'hybridation avec les sets d'amorces et de sondes utilisées.

15

**Amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du génome du virus de l'hépatite C.**

**5    DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention concerne de nouveaux sets d'amorces et de sondes ciblant une région conservée du VHC appelée 5'UTR et leur utilisation pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du VHC dans des échantillons biologiques et pour la préparation de la gamme étalon (courbe standard) issue du clonage d'une séquence nucléotidique se situant dans la  
10 région 5'UTR, d'une taille de 500 pb ,du même virus dans un plasmide bactérien (cette séquence pourra aussi servir de contrôle positif des amplifications).

La région 5' UTR du VHC contient les séquences les plus conservées du génome. Son haut degré de conservation en fait une région de choix pour la sélection d'amorces utilisées lors de la transcription inverse et de l'amplification de l'ARN du VHC par PCR conférant ainsi à la  
15 technique une excellente sensibilité pour une application diagnostic (Casanova et *al*, 2014).

Les sets d'amorces et de sondes de la région cible conservée du VHC sont plus sensibles que ceux citées dans la littérature et seront utilisées en PCR en temps réel (qPCR) en format simplex ou multiplex pour une quantification fiable, rapide et moins couteuse.

La présente invention sera éventuellement à la base d'un nouveau kit pour le diagnostic  
20 moléculaire, en réaction simplex ou duplex, du VHC à partir d'un échantillon biologique donné.

**ART ANTERIEUR**

L'hépatite est une infection systémique du foie ayant diverses origines (virale, bactérienne, alcoolique, médicamenteuse, vasculaire ou auto-immune) et son évolution dépend de l'agent  
25 en cause (hépatite virale/hépatite non virale). L'hépatite virale (notées de A à G) est un problème mondial de santé publique touchant des millions de personnes chaque année et provoquant des incapacités et des décès (Choo et *al.*, 1991) .

Selon l'organisation mondiale de la santé, l'hépatite C touche quelque 200 millions de personnes dans le monde et environ 170 millions sont des porteurs chroniques du VHC (WHO, 2005 ; Butt, 2005). À terme, la maladie peut entraîner une cirrhose, une insuffisance hépatique et un carcinome hépatocellulaire, qui, à eux trois, sont responsables de centaines de milliers de  
5 décès chaque année. Toutefois, il est important de souligner que les chiffres sont approximatifs vu que beaucoup de malades sont porteurs du virus sans le savoir. Le Maroc est classé parmi les zones endémiques à l'échelle mondiale (près d'un Marocain sur 30 est atteint soit de l'hépatite B, soit C) avec, en moyenne, 300.000 porteurs du VHC (Zohoum et *al.*, 2011 ; Belbacha et *al.*, 2011;Baha et *al.*, 2013).

10 Première cause de cancer de foie, l'hépatite C serait, dans 20 ans, la cause directe de 44.000 décès au Maroc dont 8.800 liés au cancer et 35.000 liés à la cirrhose. Si aujourd'hui un vaccin contre l'Hépatite B est disponible, il n'en est pas de même pour l'Hépatite C qui est une maladie à prendre très au sérieux. Des progrès considérables ont été accomplis aussi bien pour le diagnostic que pour la prise en charge thérapeutique.

15 Il existe une variabilité génomique du VHC liée au taux d'erreurs de l'ARN polymérase qui définit des génotypes et des quasi-espèces. Les génotypes viraux sont des marqueurs épidémiologiques : Les génotypes 1, 2 et 3 sont ubiquitaires ; Le génotype 4 est retrouvé exclusivement en Afrique Centrale et en Egypte ; Le génotype 5 en Afrique du Sud et le génotype 6 en Asie. Le génotype 1 étant le plus fréquent à l'échelle mondiale puisqu'il est  
20 responsable de plus de 42% de toutes les infections à VHC suivi du génotype 3 (26%) et du génotype 4 (17%). Au Maroc le génotype 1b est le plus fréquent (Hnatyszyn, 2005) .

Ces génotypes sont aussi des indicateurs de sensibilité aux interférons : les génotypes 1 et 4 sont moins sensibles au traitement par l'interféron que les génotypes 2 et 3 (Hoofnagle , 2002).

Le virus de l'hépatite C (VHC), appartenant à la famille des *Flaviviridae*, est un virus à ARN  
25 linéaire simple brin à polarité positive, long de 9600 nucléotides qui codent une polyprotéine unique d'environ 3 000 acides aminés. Le génome du VHC se compose de trois parties (Choo et *al.*, 1991 ; Choukhi et *al.*, 1998) : la région 5' non codante (très organisée et hautement conservée avec une similarité qui atteint au minimum 90 % pour les souches de VHC entre elles) ; la région 3' non codante (fortement conservée de manière intra génotypique) et enfin la  
30 phase ouverte de lecture (ORF, Open Reading Frame) (Casanova et *al.*, 2014).

Les moyens de diagnostic du VHC sont divers et de plus en plus sensibles : les tests indirects à la recherche des anticorps anti-VHC (ELISA) qui sont reproductibles mais les cas de faux négatifs sont très fréquents, et les tests directs recherchant l'ARN viral qui sont de plus en plus sensibles mais ne sont pas toujours disponibles et ont un coût élevé (PCR). L'utilisation de ces tests a été  
5 codifiée grâce aux nouvelles recommandations des sociétés savantes. Cependant, l'évaluation de l'atteinte hépatique demeure controversée et la ponction-biopsie hépatique reste le gold standard.

Le dépistage de l'hépatite C commence par des tests sérologiques permettant de détecter les anticorps (AC) anti-VHC (ELISA). La présence de ces AC anti-VHC pour les sujets ayant deux tests  
10 de dépistage positifs (ou des tests discordants), révèle une exposition au virus, mais ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une infection en cours ou d'une infection ancienne qui a pu guérir spontanément. Toutes les personnes ayant des AC anti-VHC positifs doivent faire l'objet de tests supplémentaires pour rechercher la présence du VHC lui-même afin de déterminer si l'infection est en cours d'évolution.

15 La présence du virus est déterminée par des méthodes moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR conventionnelle et en temps réel), ou d'autres techniques d'amplification. La PCR en temps réel est fondée sur la détection et la quantification des produits d'amplification au cours de la réaction de PCR, dans un tube fermé, plutôt qu'à la fin de la réaction comme c'est le cas des techniques de PCR classiques. Elle présente l'avantage de  
20 quantifier l'acide nucléique viral initial sur un intervalle plus étendu de valeurs que les techniques classiques, et ce, avec la même efficacité mais plus de sensibilité.

Cette technique très sensible, fiable et rapide, a la capacité de détecter non seulement la présence du virus, mais aussi de mesurer la quantité de virus présent dans le sang (charge virale du VHC). Le suivi de la charge virale HCV permet de contrôler l'efficacité du traitement  
25 conjointement avec le dosage des transaminases (ALAT). L'objectif est la guérison avec une charge virale HCV indétectable 6 mois après l'arrêt du traitement. Cependant, la PCR en temps réel présente un intérêt primordial puisqu'elle peut préciser le type de traitement, sa durée et permet le suivi des patients.

Il faut noter que la recherche d'ARN viral devrait être proposée lorsque la recherche  
30 d'anticorps est négative, mais qu'il existe une suspicion élevée d'hépatite C (en raison par

exemple de l'élévation des transaminases (ALAT) chez quelqu'un qui présente des facteurs de risque pour l'hépatite C). Chez les personnes pour lesquelles l'infection par le VHC est confirmée, la détermination du génotype est généralement recommandée afin de déterminer la durée requise du traitement et d'évaluer les chances de réponse au traitement par l'interféron. Le génotypage du virus est le plus souvent réalisé par séquençage (ou hybridation) d'une région du génome viral.

### EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention concerne en général la détection du virus de l'hépatite type C. De manière plus spécifique, la présente invention fait référence à un procédé d'amplification, de détection et/ou de quantification du VHC dans un échantillon de patient en utilisant un ensemble de nouvelles sondes et amorces par méthode PCR.

Le procédé de la présente invention représente une amélioration des autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet a) de gagner en spécificité et en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces plus spécifiques et plus sensibles b) de détecter, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, toutes les variantes virales du VHC, étant donné que les sondes et amorces de la présente invention sont conçues de telle manière à détecter tous les génotypes décrits jusqu'à présent, ce qui permettra un gain supplémentaire en spécificité. Selon la présente invention, la détection et la quantification des transcrits des gènes cibles se font par la méthode PCR en différentes étapes a) Conception et synthèse des nouvelles séquences nucléotidiques de sondes et d'amorces qui s'hybrident spécifiquement sur les régions cibles ou sur la séquence nucléotidique clonée dans un plasmide bactérien b) le contrôle positif est un ARN viral (VHC) désactivé qui va suivre la même procédure d'analyse qu'un échantillon biologique à tester. c) Selon une autre caractéristique de l'invention, la quantification plus sensible et plus spécifique des transcrits de la région cible 5'UTR se fait par une extrapolation du nombre de copie des transcrits des gènes cibles à partir d'une gamme étalon (courbe standard) par quantification absolue en utilisant un plasmide bactérien contenant une séquence nucléotidique synthétisée (SEQ ID NO 13).

Selon une caractéristique de la présente invention, a) par exemple les sets d'amorces permettant la détection des transcrits de la région cible 5'UTR dans un échantillon biologique ont les séquences d'oligonucléotidiques suivantes :

5 Set 1 : SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2,

Set 2: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5,

Set 3: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

Set 4: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,

10 b) les sondes pour détecter le transcrit de la région cible (5'UTR) ont des séquences oligonucléotidiques sélectionnées parmi un groupe de :

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12.

Selon une autre caractéristique de la présente invention, la séquence nucléotidique synthétisée et qui va être clonée dans un plasmide bactérien a une séquence nucléotidique SEQ  
15 ID NO : 13.

En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient les transcrits de la région cible 5'UTR du VHC dans un échantillon biologique incluent, a) l'ensemble des amorces «forward» ayant des séquences: SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 10 et l'ensemble des amorces «reverse» ayant des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 5, SEQ ID  
20 NO : 8, SEQ ID NO : 11.

La présente invention concerne aussi une méthode pour la détection des transcrits de la région cible dans un même échantillon biologique. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes, a) mettre en contact un échantillon biologique avec une amorce «forward» ayant une séquence  
25 parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 10 et une amorce «reverse» sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 11, dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible, b) Détecter l'amplification des différentes séquences cibles, dans un même échantillon biologique avec quatre sondes différentes qui ont une séquence SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO :  
30 9, SEQ ID NO : 12.

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

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

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

10

#### BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

**Figure 1 :** Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn pour les transcrits de la région 5'UTR avec les différents sets de l'invention. Le plasmide qui contient l'insert  
15 constitue par une séquence de la région 5'UTR est utilisé comme matrice d'amplification par la PCR en temps réel. Pour la même quantité d'ADNc les sets d'amorce de la présente invention donnent un signal plus précoce que celui donné par le set d'amorce le plus utilisé dans la littérature.

**Figure 2 :** Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn pour les transcrits  
20 de la région 5'UTR SEQ ID NO 13 avec le set 3. Le plasmide qui contient l'insert constitué par une séquence de la région 5'UTR est utilisé comme matrice d'amplification par la PCR en temps réel. Une gamme étalon a été préparée à partir d'une quantité de 12,5ng suivant une dilution de 1/10.

**Figure 3 :** Graphique représentant la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon du  
25 plasmide contenant la séquence cible 5'UTR SEQ ID NO 13. Le nombre de copy est représenté en fonction des Ct. La courbe standard a une efficacité de 97,54% et une corrélation de 0,999.

**Figure 4 :** Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn pour les transcrit de la région 5'UTR SEQ ID NO 13 avec le set 5. Le plasmide qui contient l'insert du gène 5'UTR



est utilisé comme matrice d'amplification par la PCR en temps réel. Une gamme étalon a été préparée à partir d'une quantité de 12,5ng suivant une dilution de 1/10.

**Figure 5 :** Graphique représentant la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon du plasmide contenant la séquence cible 5'UTR SEQ ID NO 13. Le nombre de copy est représenté en fonction des Ct. La courbe standard a une efficacité de 89,29% et une corrélation de 0,997.

**Figure 6 :** Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn pour les transcrits de la région 5'UTR SEQ ID NO 13 avec le set 5 et 3. Le plasmide qui contient l'insert du gène 5'UTR est utilisé comme matrice d'amplification par la PCR en temps réel. Une gamme étalon a été préparée à partir d'une quantité de 12,5ng suivant une dilution de 1/10. Le Set 3 détecte l'ADN cible d'une manière plus précoce que le set 5.

#### EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

La présente invention préconise de nouvelles sondes et amorces qui peuvent être utilisés pour amplifier, détecter et quantifier avec plus de fiabilité une région conservée au niveau du génome viral du VHC dans un échantillon biologique.

L'invention préconise aussi une méthode d'amplification, de détection et/ou de quantification par PCR ou RT-qPCR, des transcrits de la région conservée cible 5'UTR dans un échantillon biologique en utilisant les sets d'amorces et sondes cités précédemment. L'ensemble des amorces et sondes de la présente invention permettent une meilleure sensibilité et spécificité pour détecter ces transcrits.

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

Le mot '5' UTR' décrit dans la présente invention, représente la région '5' UnTranslated Region' qui est l'extrémité 5'-non-traduite du VHC. Dans cette région se trouve un IRES (Site Interne d'entrée du Ribosome) responsable de l'initiation de la traduction. La région 5' UTR du VHC contient les séquences les plus conservées du génome. Son haut degré de conservation en fait une région de choix pour la sélection d'amorces utilisées lors de la transcription inverse et de l'amplification de l'ARN du VHC par PCR permettant une excellente sensibilité de la technique pour le diagnostic.

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

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

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

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

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

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

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

Le mot 'PCR' (polymerase chain reaction) utilisé dans la présente invention réfère à une méthode dont un échantillon d'ADNc ou d'ADN est ajouté dans une solution en présence de  
25 nucléotides non attachés (exemple les dNTPs), 2 oligonucléotides amorces (forward et reverse); et de l'enzyme ADN polymérase (préférentiellement la Taq polymérase résistant à la chaleur) qui permet la catalyse et la formation d'ADN à partir des 2 amorces et dNTPs. Le mélange réactionnel est chauffé, à 94-96 C° pour dénaturer la molécule d'ADN et former 2 brins simples

d'ADN. Les amorces vont ensuite se fixer spécifiquement sur l'ADN simple brin permettant ainsi à l'ADN polymérase de catalyser l'attachement des dNTPs aux amorces.

Le mot 'RT-qPCR' (reverse transcriptase-real time PCR) utilisé dans la présente invention représente une méthode de PCR en temps réel 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. La détection et la quantification du nombre de copies d'un gène cible présent initialement dans un échantillon biologique par qPCR, est généralement dérivée de son  $C_T$  (cycle threshold). Le CT dépend de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon biologique amplifié et correspond au nombre de cycles d'amplification où la courbe d'amplification croise la ligne de seuil. Cette ligne est placée au niveau de la phase exponentielle, de façon à se distinguer clairement du bruit de fond.

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

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

Le cycle seuil 'C<sub>T</sub>' utilisé dans la présente invention est le nombre de cycles de PCR pour lequel le niveau de fluorescence atteint le seuil. Une valeur C<sub>T</sub> >8 et <35 est souhaitable. Une valeur C<sub>T</sub> <8 montre que la concentration de départ en acides nucléiques utilisée dans la réaction est élevée. Par contre une valeur C<sub>T</sub>>35montre que la concentration de départ en acides nucléiques utilisée dans la réaction est faible.

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

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

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

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

## EXEMPLES

**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  
25 décrites dans ce protocole.

**L'exemple 2:** Figure 1 et Figure 2 décrivent la haute sensibilité et spécificité de la qPCR de la présente invention pour amplifier, détecter et/ou quantifier le virus de l'hépatite C (VHC).

Les résultats de la qPCR de la présente invention sont représentés dans la Figure 1 (courbe d'amplification : cycle-vs-  $\Delta Rn$ ), Figure 2 (courbe standard : quantité d'ADNc de VHC vs-valeurs  $C_T$ ). 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 : un slope de -3,382, un  $R^2$  de 0,999 et une efficacité de 97,451 pour le Set 3 (Figure 2) ; un slope de -3,608, un  $R^2$  de 0,997 et une efficacité de 89,292 pour le Set 5 (Figure 4); Les courbes d'amplification (Figure 1) montrent aussi des allures parfaites.

## EXPERIENCES

### 10 Protocole de qPCR de la présente invention pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du virus de l'hépatite type C

L'extraction de l'ARN à partir du matériel biologique a été faite par le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) suivant les recommandations des fournisseurs. La quantité de l'ARN a été mesurée au NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC), tandis que la qualité et la pureté de l'ARN obtenues sont testées par électrophorèse sur gel d'agarose et/ou par le Bioanalyzer (Biorad).

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu à partir de l'ARN total extrait des échantillons testés. La synthèse d'ADNc est réalisée à l'aide du Thermocycleur (AppliedBiosystems) en utilisant le kit RNA to cDNA Reverse Transcription selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystems).

Chaque couple d'amorces sens (forward) et anti-sens (reverse) et la sonde (probe) correspondante ciblant la région 5'UTR et 5 $\mu$ l d'ADNc de l'échantillon sont ajoutés au master mix de la réaction qPCR (TaqMan Fast Universal PCR Master mix : AppliedBiosystems) pour un volume réactionnel final de 25 $\mu$ l.

25 Dans le cas de la réaction en format simplexe, seuls la sonde et le couple d'amorces ciblant la région 5'UTR ou le contrôle interne sont utilisés dans différent puits de la réaction qPCR ; alors que pour la réaction en format multiplexe au moins deux sondes et deux couples d'amorces

ciblant la région 5'UTR et/ou le contrôle interne sont utilisés simultanément dans le même puits de la réaction qPCR.

Les conditions du cycle thermal de la qPCR de la présente invention sont divisées en différentes  
5 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 l'analyse de l'expérience, de la présente invention, de quantification absolue par  
méthode des courbes standard. La valeur de l'efficacité de l'amplification (E) est calculée en  
10 utilisant la pente de la droite de régression dans la courbe standard. Une pente proche de -3,3  
indique une efficacité optimale (100 %) de l'amplification par PCR. La valeur  $R^2$  (coefficient de  
corrélacion) indique la proximité entre la droite de régression et les points de données  $C_T$  des  
réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite  
de régression et les points de données. Une valeur  $R^2 >$  ou égale à 0,99 est souhaitable.

15

Des séries de dilutions des plasmides utilisés dans cette présente invention et des ADN  
complémentaires (ADNc) à tester sont nécessaires. Les concentrations utilisées sont 1,25pg,  
12,5pg, 125pg, 1,25ng et 12,5ng avec un facteur de dilution égal à 1/10. Pour chaque  
expérience, chaque point de la gamme étalon est réalisé, au minimum, en duplicata ainsi qu'un  
20 contrôle négatif (eau) et un contrôle positif (ARN viral désactivé du virus de l'hépatite C) seront  
toujours inclus dans l'expérience.

Pour la performance de la qPCR de la présente invention et afin d'amplifier, de détecter et/ou  
de quantifier la région cible 5'UTR du VHC (courbe d'amplification et courbe standard), les  
25 séquences des amorces et des sondes spécifiques utilisées en Figure 1, Figure 2 et Figure 4 sont  
listées dans le tableau suivant:

30

Tableau 1 : liste des amorces et sondes utilisées dans les expériences de la présente invention

Sets	Sens	Séquence nucléotidique (5'-3')	SEQ ID	Longueur (pb)
SET1	F	AGTGTCGTGCAGCCTCC	SEQ ID NO 1	18
	R	TTATCCAAGAAAGGACCCGGTC	SEQ ID NO 2	20
	S	TCACCGGTTCCGCAGACCACTATG	SEQ ID NO 3	24
SET2	F	TGTCTTCACGCAGAAAGC	SEQ ID NO 4	18
	R	GTTCCGCAGACCACTATG	SEQ ID NO 5	18
	S	CCTGGAGGCTGCACGACACT	SEQ ID NO 6	20
SET3	F	ACCGGGTCCTTTCTTGGATA	SEQ ID NO 7	20
	R	CAACTACTCGGCTAGCAG	SEQ ID NO 8	20
	S	CGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCG	SEQ ID NO 9	30
SET4	F	TCAATGCCTGGAGATTTGGG	SEQ ID NO 10	20
	R	AAGCACCTATCAGGCAGTA	SEQ ID NO 11	20
	S	CGTGCCCCCGCAAGACTGCTAG	SEQ ID NO 12	25
SET5	F	AGCGTCTAGCCATGGCGT	Littérature set Shahzamani et al. 2010	20
	R	CAAGCACCTATCAGGCAGT		20
	S	GCAGCCTCCAGGACCCCC		25

F= amorce forward

R= amorce reverse

S= sonde

pb : paire de base

La séquence nucléotidique contenant la région cible conservée 5'UTR du virus de l'Hépatite C de la taille de 500pb (SEQ ID NO 13) est la suivante:

5'TTGGGGGCGCAGACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCT

```

AGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCT
GCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATG
CCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTG
GTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAAT
CCTAAACCCCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTCCCGGGTGG
CGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGA
GGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAA3'

```

### Références Bibliographiques :

- 5
- Casanova YS, Thais da Rocha Boeira, Elisa Sisti, Álvaro Celmer, André Salvador Kazantzi Fonseca, Nilo Ikuta, Daniel Simon and Vagner Ricardo Lunge - A molecular biology assay for HCV analysis Rev Soc Bras Med Trop 47(3):287-294, May-Jun, 2014.
  - World Health Organization: Western Pacific regional plan for hepatitis B control through immunization. Philippines: Regional Office for the Western Pacific Manila; [http://www.wpro.who.int/publications/publications.htm].
- 10
- Butt AA: Hepatitis C virus infection: the new global epidemic. Expert Rev Anti Infect Ther 2005, 3:241-249.
  - Warda Baha, Abderrahim Foulous, Noureddine Dersi, Thierry Paluku They-they, Khadija El alaoui, Nadia Nourichafi, Bouchra Oukkache, Fatiha Lazar, Soumaya Benjelloun, My Mustapha Ennaji, Abdelouhad Elmalki, Hassan Mifdal and Abdelouaheb Bennani.
- 15
- Prevalence and risk factors of hepatitis B and C virus infections among the general population and blood donors in Morocco. BMC Public Health 2013. 13:50.
  - Belbacha I, Cherkaoui I, Akrim M, Dooley KE, El Aouad R: Seroprevalence of hepatitis B and C among barbers and their clients in the Rabat region of Morocco. East Mediterr Health J 2011, 17(12):911-919.
- 20



- Zohoun A, Hadeif R, Zahid H, Benkirane M: Seroprevalence of HBV and HCV in blood donors at the Blood Transfusion Center of Mohammed V Military Teaching Hospital in Rabat Morocco. *Med Trop* 2011, 71(5):513–514.
- Hnatyszyn H James. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antiviral Therapy* 2005. 10:1–11.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88:2451-2455.
- Choukhi A, Ung S, Wychowski C, Dubuisson J. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* 1998; 72:3851-3858.
- Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36:S21-S29.
- Shahzamani, K., Merat, S., Rezvan, H., Siamak Mirab-Samiee, Hooman Khademi, Reza Malekzadeh and Farzaneh Sabahi. (2010). Development of a low-cost real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for the detection and quantification of hepatitis C viral load. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(6), pp. 777-784.

15

20

25

**Revendications :**

1. Composition d'oligonucléotides pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'un ou de plusieurs variantes du virus de l'hépatite C (VHC) dans un échantillon biologique, **caractérisée en ce qu'elle** est constituée d'une amorce « forward » choisie parmi les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4 , SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 10 et d'une amorce « reverse » choisie parmi les séquences SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 11 et d'une sonde (probe) choisie parmi les séquences SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12.
2. Méthode pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'un ou de plusieurs variantes du virus de l'hépatite C (VHC) dans un échantillon biologique, **caractérisée en ce que** la méthode comprend les étapes suivantes:
  - Extraction de l'ARN à partir d'un échantillon biologique provenant d'un patient.
  - Test de qualité et de quantité de l'ARN par électrophorèse, Nanodrop ou par bioanalyseur.
  - Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN total extrait de l'échantillon biologique et réalisé à l'aide du thermocycleur.
  - Ajout de 5 µl d'ADNc au master mix de la réaction qPCR et d'une amorce « forward » choisie parmi les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4 , SEQ ID NO 7 , SEQ ID NO 10 et d'une amorce « reverse » choisie parmi les séquences SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 11 et d'une sonde (probe) choisie parmi les séquences SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12, pour un volume final d'au moins 25µl..
  - Application du cycle thermal de la qPCR.
  - Détection et/ou quantification relative ou absolue du VHC en utilisant une gamme étalon contrôle (courbe standard)
3. Méthode, selon la revendication 2, **caractérisée en ce que** l'échantillon biologique est soit un tissu hépatique ou un fluide corporel sélectionné parmi le sang, le sérum, le sperme, le plasma ou la salive.
4. Méthode, selon les revendications 2 à 3, **caractérisée en ce que** la gamme étalon contrôle (courbe standard) est obtenue par une dilution en série d'un vecteur

contenant la SEQ ID NO 13, ou d'une partie de cette séquence se situant dans la région conservée 5'UTR, d'un Virus de l'Hépatite type C.

5. Méthode selon les revendications 2 à 4, **caractérisée en ce que** les sondes pour amplifier, détecter et/ou quantifier le VHC, sont attachées à des entités fluorescentes (reporters) et à des inhibiteurs de fluorescence (quencher) et en ce que 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'.
6. Méthode selon les revendications 2 à 5, **caractérisée en ce que** l'amplification, la détection et/ou la quantification du VHC dans un échantillon biologique est effectuée de façon séparée (format simplexe) ou simultanée dans un même puits de qPCR (format multiplexe).
7. Méthode selon les revendications 2 à 6, **caractérisée en ce que** le degré d'expression est mesuré à l'échelle d'ARN.
8. Méthode selon les revendications 2 à 7, **caractérisée en ce que** ladite méthode comprend au moins une des techniques d'amplification génique: PCR conventionnelle, PCR en temps réel (qPCR), transcription inverse PCR (RT-PCR) ou transcription inverse qPCR (RT-qPCR).

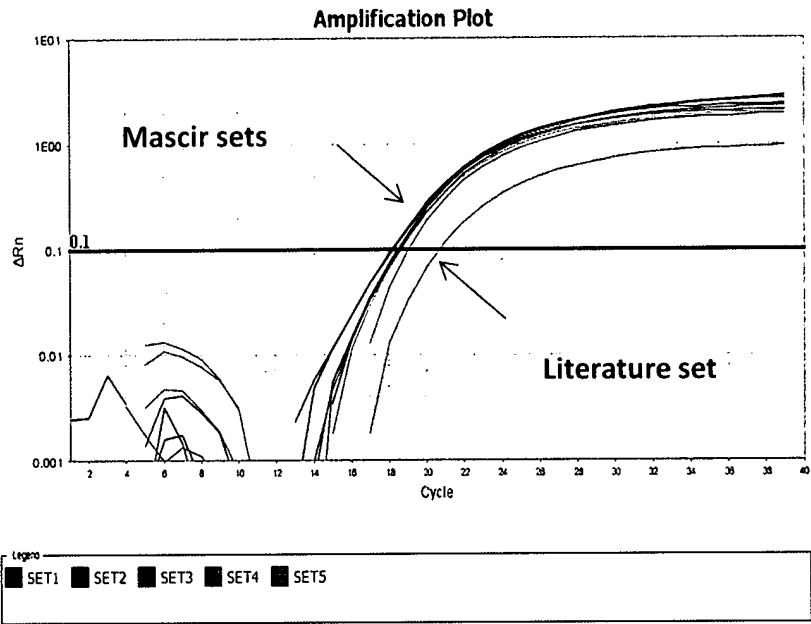


Fig. 1

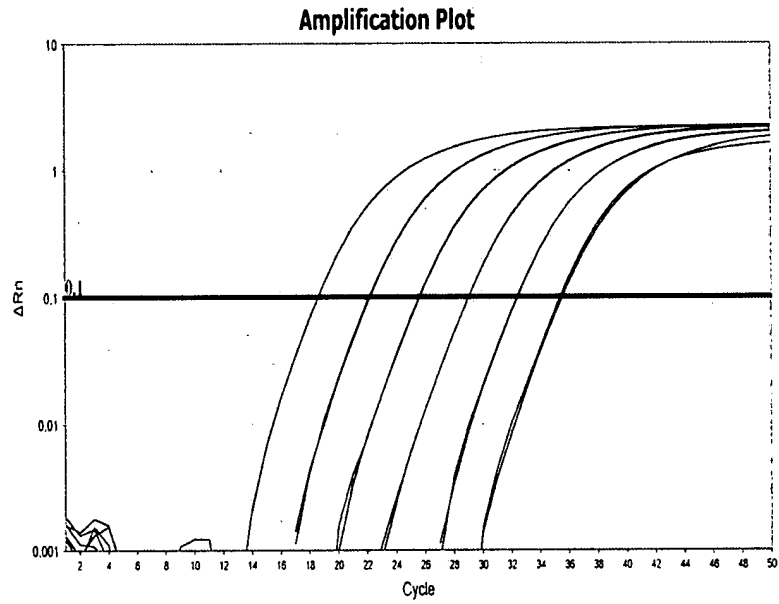


Fig. 2

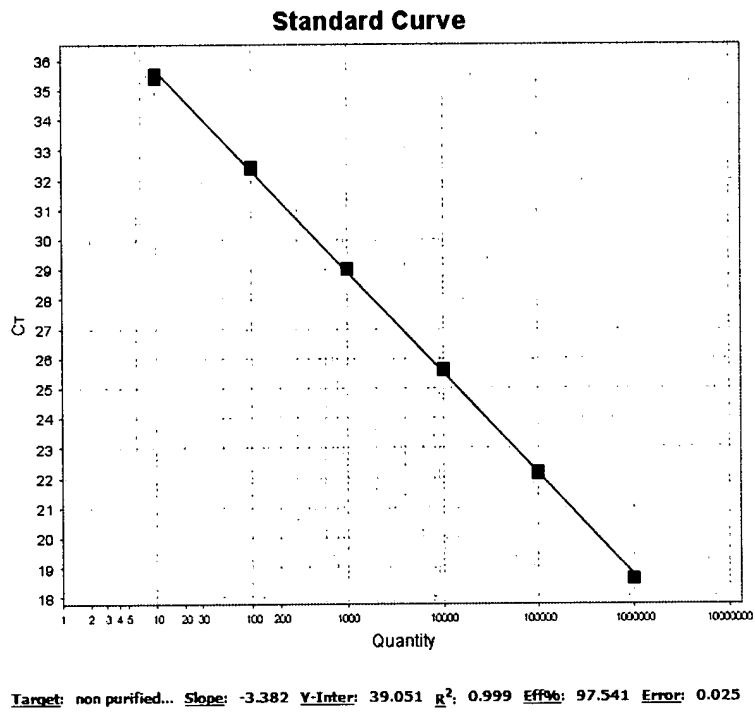


Fig. 3

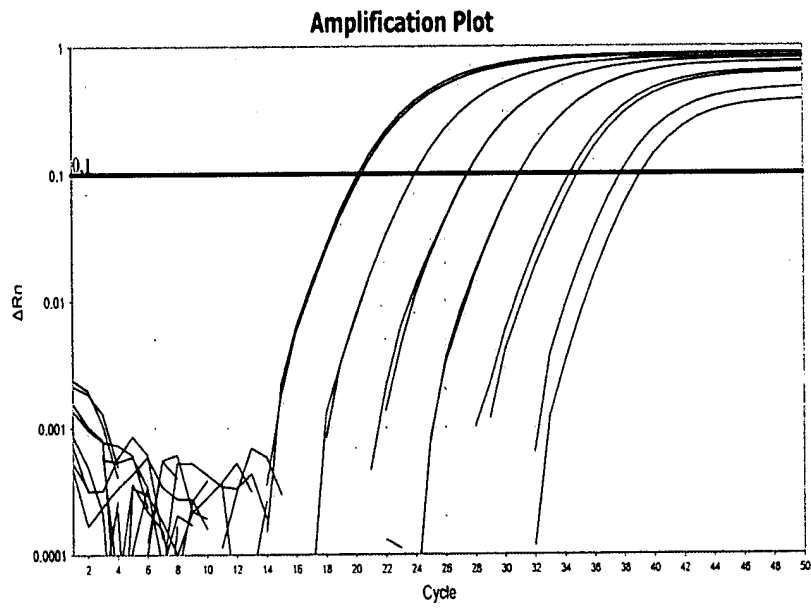


Fig.4

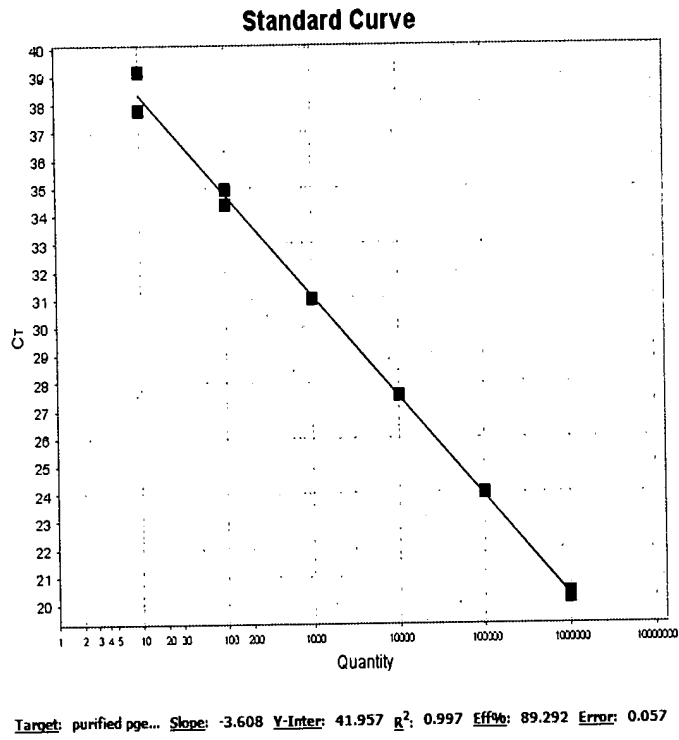


Fig. 5

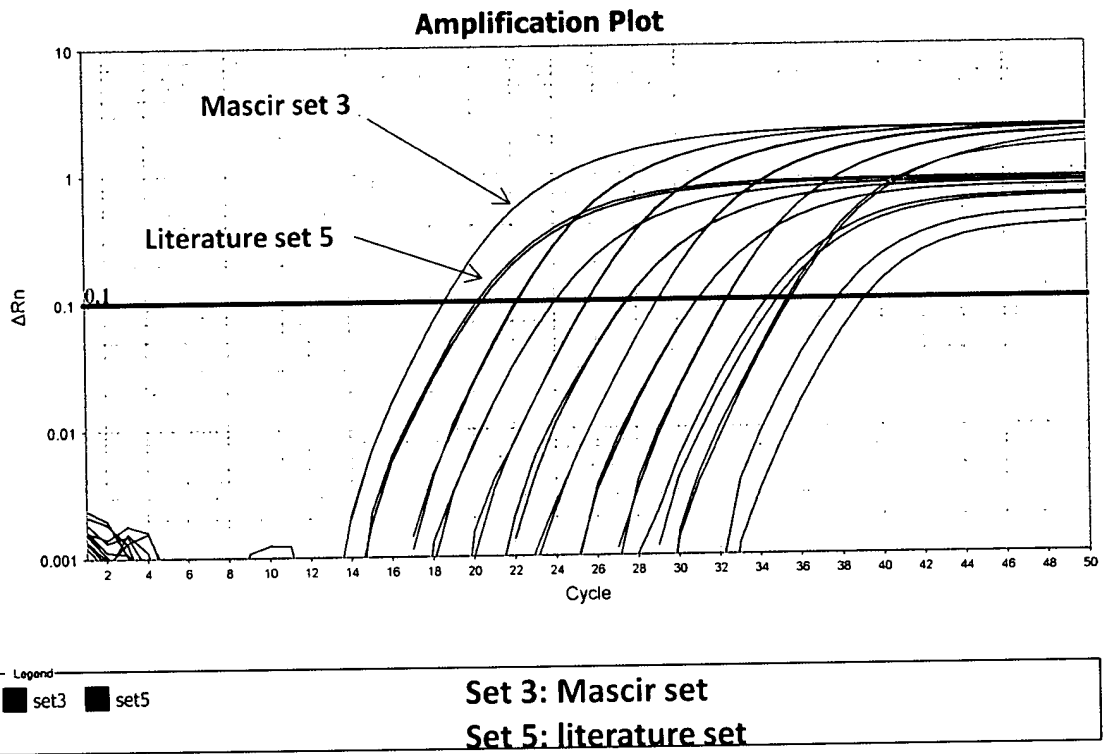


Fig. 6

ROYAUME DU MAROC  
\*\*\*\*\*  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
\*\*\*\*\*



المملكة المغربية  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
\*\*\*\*\*

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 38741	Date de dépôt : 29/12/2015 ;
Déposant : MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	
Intitulé de l'invention : Amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification du génome du virus de l'hépatite C	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée	
<input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: M. Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 15/04/2016
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

**Partie 1 : Considérations générales**

*Cadre 1 : base du présent rapport*

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

- Description  
15 Pages
- Revendications  
8
- Planches de dessin  
6 Pages

**Partie 2 : Rapport de recherche**

**Classement de l'objet de la demande :**

CIB : C12Q1/68 ;

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
Y	EP1383782; 28/01/2004; Sirna Therapeutics Inc	1
Y	WO03070750 ; 28/08/2003 ; Sirna Therapeutics	1
A	Real-Time PCR Assays for Hepatitis C Virus (HCV) RNA Quantitation Are Adequate for Clinical Management of Patients with Chronic HCV Infection; 07/2006; Philippe Halfon; Marc Bourlière; Guillaume Pénaranda; Hacène Khiri; Denis Ouzan	1-8

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« 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  
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs  
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté



**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**

*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 2-8 Revendications 1	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : EP1383782; 28/01/2004; SIRNA THERPEUTICS INC [US]

D2 : WO03070750 ; 28/08/2003 ; Sirna Therapeutics

D3 : Real-Time PCR Assays for Hepatitis C Virus (HCV) RNA Quantitation Are Adequate for Clinical Management of Patients with Chronic HCV Infection; 07/2006; Philippe Halfon; Marc Bourlière; Guillaume Pénaranda; Hacène Khiri; Denis Ouzan

#### 1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit une composition d'amorces avec les séquences revendiquées la méthode de détection impliquant cette composition d'amorces n'est pas divulguée n'en plus, d'où les objets des revendications 1 et 2 sont nouveaux. Par la suite toutes les revendications dépendantes le sont.

#### 2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue la SEQ ID NO 1 et la SEQ ID NO 3 par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 par les amorces reverse utilisées.

Le problème que la revendication 1 se propose de résoudre peut donc être considéré comme fournir une amorce reverse alternative. Le document D2 divulgue l'utilisation des séquences SEQ ID NO 8 et la SEQ ID NO 11.

La combinaison des documents D1 et D2, tous deux concernant l'expression génique du virus de l'hépatite C, permet d'aboutir à deux compositions parmi les alternatives revendiquées dans la revendication 1. La revendication 1 est par conséquent évidente.

La revendication 1 ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, l'objet de la revendication 1 n'étant pas conforme au critère d'activité inventive.

Le document D3 considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 2, divulgue des dosages et quantifications de l'hépatite C (VHC) ARN par qPCR, par conséquent l'objet de la revendication 2 diffère de D3 par les compositions d'amorces utilisées. Le problème que l'invention des revendications 2 à 8 se propose de résoudre peut donc être

considéré comme un procédé alternatif pour l'amplification et la détection du virus de l'hépatite C.

L'art antérieur ne permet pas d'aboutir de manière évidente à un procédé ayant ces caractéristiques.

Les revendications 2-8 vérifient l'activité inventive puisqu'elles sont non évidentes à l'égard de l'art antérieur.

**3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

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