



(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 39525 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/68**
(43) Date de publication : **28.09.2018**

-
- (21) N° Dépôt : **39525**
(22) Date de Dépôt : **07.12.2016**
(71) Demandeur(s) : **Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR), Rabat Design Center, Rue Mohamed Al Jazouli, Madinat Al Irfane, 10100 Rabat (MA)**
(72) Inventeur(s) : **MOUMEN Abdeladim ; EL HADI Hicham ; AIT BENHASSOU Hassan**
(74) Mandataire : **AMMANI Abdelhaq**

-
- (54) Titre : **Kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification de la charge virale du virus de l'hépatite C**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne un kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type C (VHC) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'une nouvelle combinaison de set d'amorces ciblant le gène S'UTR du virus de l'hépatite C avec un autre set ciblant un gène 10 control. La dite invention porte sur la combinaison pour la première fois de ces sets d'amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'une région spécifique (S'UTR) au niveau du génome du VHC couplé à la détection d'un nouveau type de control interne présent naturellement dans le plasma humain et utilisée pour la première fois, en 15 utilisant la méthode de PCR en temps réel (qPCR). Cette invention préconise aussi l'utilisation d'un plasmide bactérien, contenant une séquence nucléotidique d'une taille de 800 paires de base (pb) se situant dans la région conservée S'UTR du VHC, pour la construction d'une gamme étalon (courbe standard) servant à la détection et la quantification fiable du VHC par des nouveaux sets d'amorces et de sondes. 20 En plus de la région spécifique S'UTR, le kit permet la détection d'une région des transcrits du gène RPL37 qui sera appelée par la suite « internal positive control » (IPC). Les sets d'amorces et de sondes de la présente invention seront utilisées en PCR conventionnelle ou en temps réel en format simplexe ou multiplexe pour une quantification fiable, rapide et moins coûteuse du VHC. 25 Les sets d'amorces et de sondes peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres sets spécifiques à des séquences autres que celles du VHC.

Kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification de la charge virale du virus de l'hépatite C.

5 **Abrégé :**

La présente invention concerne un kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification, d'un ou de différents génotypes du virus de l'hépatite virale type C (VHC) présents dans un même ou différents échantillons biologiques, au moyen d'une nouvelle combinaison de set d'amorces ciblant le gène 5'UTR du virus de l'hépatite C avec un autre set ciblant un gène control .

La dite invention porte sur la combinaison pour la première fois de ces sets d'amorces et sondes pour l'amplification, la détection et/ou la quantification d'une région spécifique (5'UTR) au niveau du génome du VHC couplé à la détection d'un nouveau type de control interne présent naturellement dans le plasma humain et utilisée pour la première fois, en utilisant la méthode de PCR en temps réel (qPCR). Cette invention préconise aussi l'utilisation d'un plasmide bactérien, contenant une séquence nucléotidique d'une taille de 500 paires de base (pb) se situant dans la région conservée 5'UTR du VHC, pour la construction d'une gamme étalon (courbe standard) servant à la détection et la quantification fiable du VHC par des nouveaux sets d'amorces et de sondes.

En plus de la région spécifique 5'UTR, le kit permet la détection d'une région des transcrits du gène RPL37 qui sera appelée par la suite « internal positive control »(IPC)

Les sets d'amorces et de sondes de la présente invention seront utilisées en PCR conventionnelle ou en temps réel en format simplexe ou multiplexe pour une quantification fiable, rapide et moins coûteuse du VHC.

Les sets d'amorces et de sondes peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres sets spécifiques à des séquences autres que celles du VHC.

Kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification la charge virale du virus de l'hépatite C.

5 DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne un kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification, d'un ou de différents géotypes du virus de l'hépatite virale type C (VHC). Le kit se compose de sets d'amorces et de sondes ciblant une région conservée du VHC appelée 5'UTR et une région des transcrits du gène RPL37 qui sera utilisé comme contrôle interne (IPC) de détection pour la
10 première fois. Cette amplification sera réalisé sur des échantillons biologiques et sur un vecteur plasmidique contenant une séquence nucléotidique qui se situant dans la région 5'UTR, d'une taille de 500 pb. L'amplification du vecteur plasmidique constituera une gamme étalon permettant la quantification absolue de la charge virale dans l'échantillon biologique a tester.

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
15 transcription inverse et de l'amplification de l'ARN du VHC par PCR conférant ainsi à la 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 et de l'IPC seront utilisées en PCR en temps réel (qPCR) en format simplex ou multiplex pour une quantification fiable,
20 rapide et moins couteuse.

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 en
25 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 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).

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.

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 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 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 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 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 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.

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 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 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 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 un kit de 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
5 de quantification du VHC dans un échantillon de patient en utilisant une nouvelle combinaison de sondes et amorces entre le gène cible du virus du VHC et un nouveau type d'IPC non utilisé jusqu'à présent dans la littérature, par les méthodes de PCR, qPCR ou RT-qPCR.

En plus du gène cible 5'UTR, le kit amplifie une autre séquence dite control interne positif de la réaction (IPC) qui est une région des transcrits du gène RPL37 présents naturellement dans le
10 plasma humain. L'amplification de l'IPC permet de s'assurer du bon déroulement de toutes les étapes en amont de l'amplification par PCR, à savoir l'extraction et la reverse transcription. L'amplification de l'IPC est primordiale pour l'analyse des résultats. Tout résultat est ininterprétable si l'IPC n'est pas amplifié pendant la réaction.

Le procédé de la présente invention représente une amélioration des autres méthodes antérieures
15 citées ci-dessus et permet a) d'utiliser un IPC innovant correspondant aux transcrits du gène RPL37, à la place des fragment d'ADN ou d'ARN qui, dans les kits disponibles, sont souvent ajoutés à l'échantillon à tester avant de procéder à l'extraction d'ARN, et retrouvés vers la fin de l'expérience dans l'étape d'analyse des courbes, témoignant du bon déroulement de toutes les étapes. L'innovation dans notre kit consiste en la détection, en plus de la séquence virale, des
20 transcrits du gène RPL37 qui sont naturellement présents dans le plasma des patients. Cette innovation permet de réduire la quantité des consommables utilisés et gagner du temps en réduisant le nombre des étapes nécessaires à la réalisation du test b) de gagner en spécificité et en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces plus spécifiques et plus sensibles c) de détecter, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, toutes les variantes virales du VHC,
25 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
30 nucléotidiques de sondes et d'amorces qui s'hybrident spécifiquement sur l'IPC, les régions cibles du virus et sur la séquence nucléotidique clonée dans un plasmide bactérien b) le contrôle

positif interne (IPC) consiste en un ARNm du gène RPL37 humain présent naturellement dans le plasma des patients malades et seins. 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

Selon une autre caractéristique de la présente invention, la séquence nucléotidique synthétisée et qui va être clonée dans un plasmide bactérien a une séquence nucléotidique SEQ ID 7.

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) une amorce «forward 5'UTR» ayant la séquence: SEQ ID NO 1 et une des amorces «reverse 5'UTR» ayant la séquence : SEQ ID NO 2 b) Une sonde «probe 5'UTR» permettant la détection de la région cible 5'UTR dans un échantillon biologique ayant la séquence oligonucléotidique :SEQ ID NO 3

En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient le transcrit de IPC dans un échantillon biologique incluent, a) une amorce «forward IPC» ayant la séquence: SEQ ID NO 4, et une amorce «reverse IPC» ayant la séquence SEQ ID NO 5.

b) Une sondes «probe IPC» pour détecter le transcrit de l'IPC ayant la séquence oligonucléotidique: SEQ ID NO 6.

La présente invention concerne aussi une méthode pour la détection des transcrits de la région cible 5'UTR et de l'IPC dans un même échantillon biologique en simplex ou en duplex. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes, a) mettre en contact un échantillon biologique avec une amorce «forward 5'UTR», une amorce «reverse 5'UTR» , une amorce «forward IPC» et une amorce «reverse IPC», dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible, b) détecter dans un même échantillon biologique l'amplification des différentes séquences cibles 5'UTR avec une sonde «probe 5'UTR» et la séquence IPC par une sonde «probe IPC».

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

5 En accord avec la méthode d'amplification (PCR, qPCR ou RT-qPCR) de la présente invention, cette 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 et IPC 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, différents IPC ont été testés pour la même quantité d'ADNc. L'IPC1 donne un signal plus précoce que celui des autres, et sera utilisé par la suite comme control dans la présente invention

15 **Figure 2 :** Graphique représentant les cycles de PCR en fonction du delta Rn pour les transcrit de la région 5'UTR (Target) et le control positif interne (IPC). Le target donne un signal plus élevé que celui de l'IPC ce qui exclu tout interférence entre les signaux des deux transcrits.

20 **Figure 3 :** Graphique représentant la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon du plasmide contenant la séquence cible 5'UTR pour la quantification absolue d'un échantillon de quantité inconnue. Le nombre de cycle est représenté en fonction du delta RN.

Figure 4 : Graphique représentant la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon du plasmide contenant la séquence cible 5'UTR pour la quantification absolue d'un échantillon de quantité inconnue. Le nombre de cycle est représenté en fonction de la quantité d'ADNc.

25 EXPOSE DETAILLE DE MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

La présente invention concerne un kit d'amplification, de 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'une nouvelle combinaison entre le gène cible 5'UTR et la détection d'un control interne innovant.

30 L'invention préconise aussi une méthode d'amplification, de détection et/ou de quantification par PCR, qPCR ou RT-qPCR, des transcrits de la région conservée cible 5'UTR et de l'IPC dans un échantillon biologique en utilisant les sets d'amorces et sondes cités précédemment.

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

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

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

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

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
25 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 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 optimales de température et en présence de d'enzyme, tampons, de nucléotides et de séquences nucléotidiques complémentaires spécifiques.

- 5 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 nucléotides non attachés (exemple les dNTPs), 2 oligonucléotides amorces (forward et reverse);
10 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.

- 15 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
20 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
25 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
30 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.

5 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.

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

15 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.

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

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

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

EXEMPLES

L'exemple 1 Figure 1 et Figure 2 montrent que le signal de l'IPC utilisé dans l'invention est détecté en premier suivi des autres IPCs, tout en restant bien éloigné du signal du gène cible, empêchant toute interférence entre les deux signaux.

- 5 **L'exemple 2:** Figure 3 et Figure 4 décrivent un exemple de la quantification d'un échantillon de charge virale inconnue par la courbe standard résultante de la gamme étalon de l'invention.

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
15 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).

20 Chaque couple d'amorces sens (forward), anti-sens (reverse) et la sonde (probe) correspondante ciblant la région 5'UTR, l'IPC et 5 μ 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 μ 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 différents 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.

30

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.

5 Dans le cas de l'analyse de l'expérience, de la présente invention, la première étape consiste en la vérification de l'amplification de l'IPC, tout résultat est ininterprétable en cas de l'absence de l'amplification de l'IPC. La deuxième étape est la quantification absolue par méthode des courbes standard du transcrite du gène cible 5'UTR. La valeur de l'efficacité de l'amplification (E) est calculée en utilisant la pente de la droite de régression dans la courbe standard. Une pente
10 proche de -3,3 indique une efficacité optimale (100 %) de l'amplification par PCR. La valeur R^2 (coefficient de corrélation) indique la proximité entre la droite de régression et les points de données C_T des réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite de régression et les points de données. Une valeur $R^2 >$ ou égale à 0,99 est souhaitable.

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 0,125pg, 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.

Les séquences des amorces et des sondes spécifiques utilisées en Figure 1, Figure 2, Figure 3 et Figure 4 sont listées dans le tableau suivant:

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

Sens	Séquence nucléotidique (5'-3')	SEQ ID	Longueur (pb)
F	AGTGTCGTGCAGCCTCC	SEQ ID NO 1	18
R	TTATCCAAGAAAGGACCCGGTC	SEQ ID NO 2	20
S	TCACCGGTCCGCAGACCACTATG	SEQ ID NO 3	24
F	ACATGGCCAAACGTACCA	SEQ ID NO 4	19

R	TGCTGGCTGATTTCAATTTT	SEQ ID NO 5	20
S	CGGTAAATACGGGACCCGCTATG	SEQ ID NO 6	23

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 7) est la suivante:

```

5'TTGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT
GGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGT
GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTG
CCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCG
AGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAACCCAAAGAAAAACCAAACGTAAC
ACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTCCCGGGTGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTACTTGTGCGCGC
AGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGGACGAGGAAGACTCCGAGCGGTGCGAA3'

```

5

10

15

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, Nouredine 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. Prevalence and risk factors of hepatitis B and C virus infections among the
15 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.
- Zohoun A, Hadeif R, Zahid H, Benkirane M: Seroprevalence of HBV and HCV in blood
20 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
25 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
30 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.

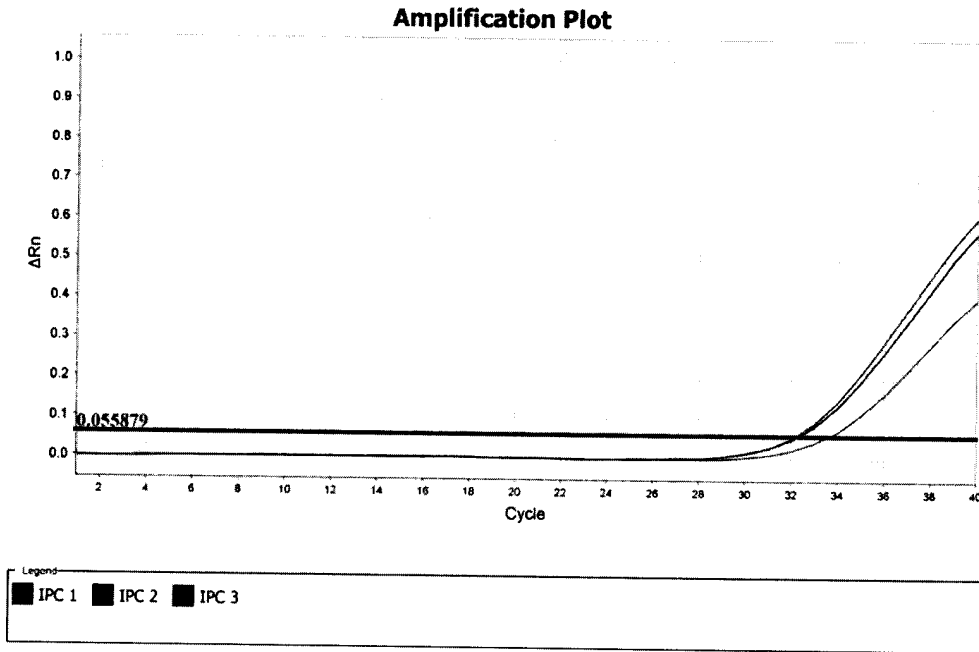


Fig. 1

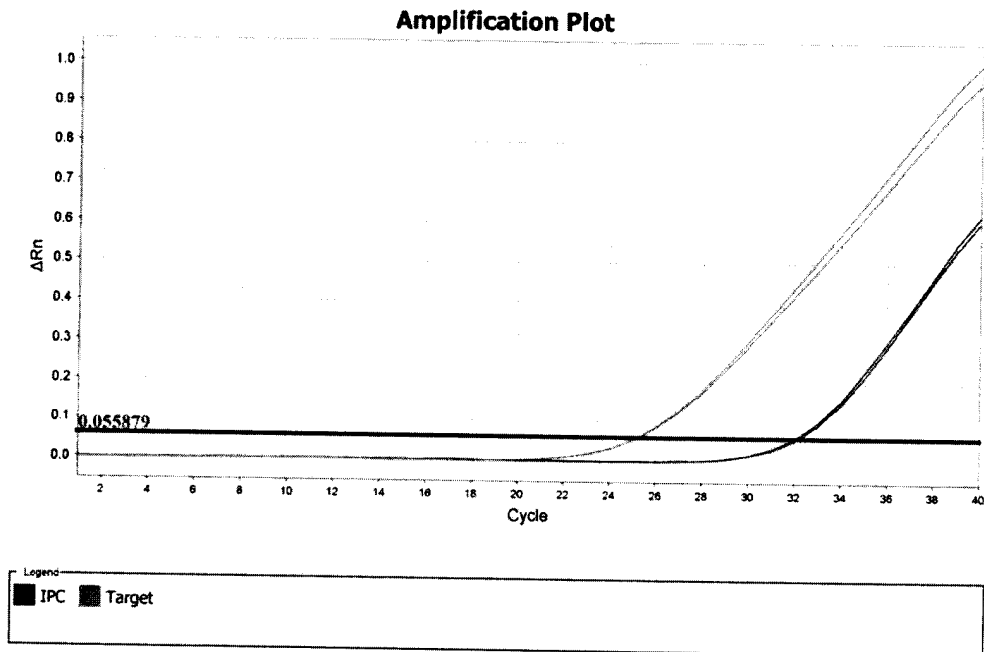


Fig. 2

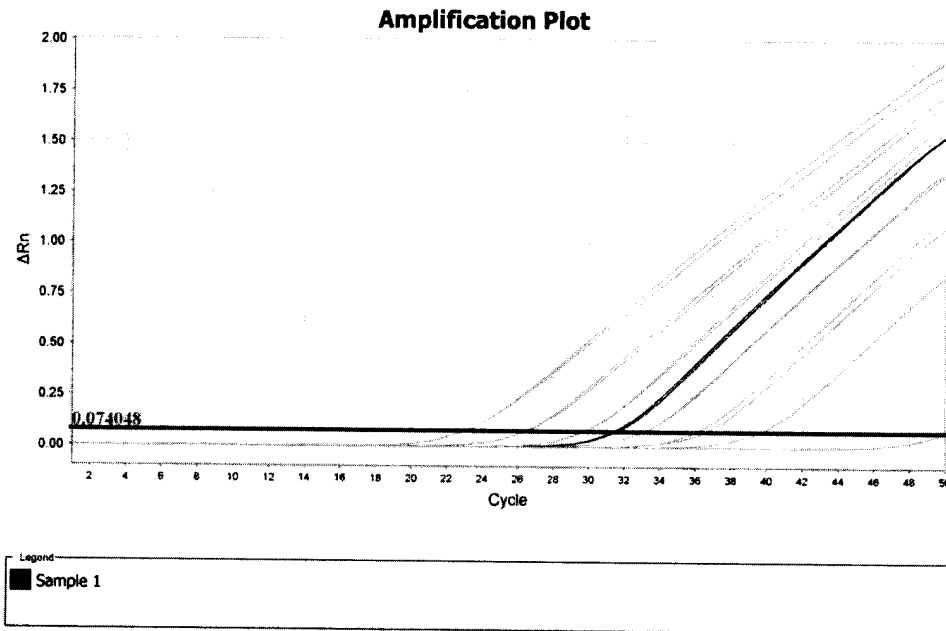


Fig. 3

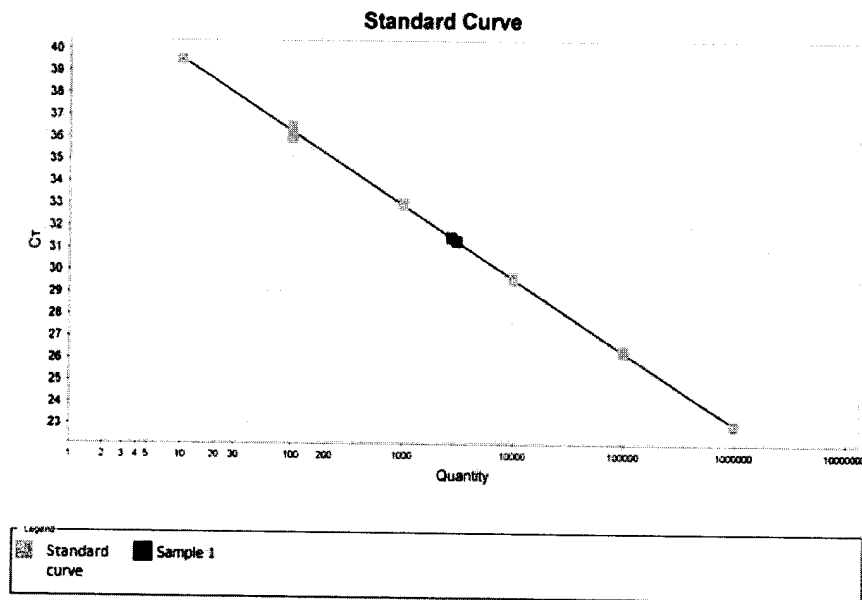


Fig. 4



**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 telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 39525	Date de dépôt : 07/12/2016
Déposant : Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR)	
Intitulé de l'invention : Kit pour l'amplification, la détection et/ou la quantification de la charge virale 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 brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
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	
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	Date d'établissement du rapport : 05/10/2017

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
113 Pages
- Revendications
8
- Planches de dessin
2 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
X A	WO2013033019; 03/07/2013; UNIV UTAH RES FOUND [US]; HAGEDORN CURT [US]	2, 3 1-7
A	EP1383782; 28/01/2004; Sirna Therapeutics Inc	1-7
A	WO03070750 ; 28/08/2003 ; Sirna Therapeutics	1-7
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	1-7

***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 1-7 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1, 4-7 Revendications 2-3	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-7 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 : WO2013033019; 03/07/2013; UNIV UTAH RES FOUND [US]; HAGEDORN CURT [US]

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit de kit de de détection du virus de l'hépatite couplée à un control interne d'un gène endogène du patient composition d'amorces avec les séquences revendiquées la méthode de détection impliquant cette composition d'amorces et la méthode utilisé ne sont pas divulguée également, 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 des revendications 1 et 2 divulgue une méthode pour déterminer l'intégrité d'un échantillon biologique en évaluant des ARN sentinelles tel que celui du gène RPL37, où l'échantillon biologique est le sang, le plasma, le sérum, la lymphe, le mucus, les expectorations, les larmes, l'urine, les selles, la salive, les tissus, les cheveux, les cellules animales ou végétales; identifier des acides nucléiques pour déterminer la qualité globale d'un échantillon de test biologique; évaluer la quantité et la dégradation processive des molécules d'acide nucléique en tant que mesure de l'intégrité de l'échantillon de test; et détecter et quantifier des marqueurs d'acides nucléiques, où l'échantillon contient facultativement des cellules, des tissus ou des fluides obtenus à partir d'un patient suspecté d'être atteint d'une maladie telle qu'une hépatite virale chronique, l'analyse par qPCR identifie des 5 'ARNs différemment exprimés de l'hépatite C, l'objet des revendications indépendantes diffère de D1 par les amorces utilisées ainsi que par les étapes d'amplification.

Le problème que la revendication 1 se propose de résoudre peut donc être considéré comme un kit 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 kit utilisant les amorces

revendiquées.

La revendication 1 vérifie l'activité inventive puisqu'elle est non évidente à l'égard de l'art antérieur.

Le problème que la revendication 2 se propose de résoudre peut donc être considéré comme adapter un protocole pour l'amplification et la détection d'ARN par qPCR.

L'amplification et la détection d'ARN par qPCR étant des opérations de routine pour l'homme du métier il est évident à partir de l'art antérieur de développer une méthode de détection et d'amplification d'ARN concomitante des gènes de l'hépatite C et du RPL37. Les revendications 2 et 3 sont par conséquent évidentes.

Par contre aucun des documents cités ne permet d'aboutir de manière évidente à une méthode utilisant les amorces revendiquées en rev4.

Les revendications 2 et 3 ne remplissent 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.

Les revendications 1 et 4 à 7 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.