



(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 41742 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/00**
(43) Date de publication : **30.08.2019**

(21) N° Dépôt :
41742

(22) Date de Dépôt :
29.12.2017

(71) Demandeur(s) :
MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE, INNOVATION AND RESEARCH (MAScIR), Rabat Design Center, Rue Mohamed Al Jazouli Madinat Al Irfane, Rabat, 10100 (MA)

(72) Inventeur(s) :
AIT BENHASSOU HASSAN ; MOUMEN ABDELADIM ; EL HADI HICHAM

(74) Mandataire :
AMMANI ABDELHAQ

(54) Titre : **Méthode pour la détermination du seuil de positivité de la surexpression de la protéine HER2 dans le cancer de sein et d'autres cancers.**

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode facile et pratique pour la détermination du seuil de positivité (threshold) pour la quantification de l'expression du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein, de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. La détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence se font par la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Un échantillon sera considéré comme positif si son taux d'expression du gène HER2 est supérieur au seuil de positivité calculé par la présente méthode.

**Méthode pour la détermination du seuil de positivité de la surexpression de la protéine
HER2 dans le cancer de sein et d'autres cancers.**

5 abrégé :

La présente invention concerne une méthode facile et pratique pour la détermination du seuil de positivité (threshold) pour la quantification de l'expression du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein, de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. La détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence se font par la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Un échantillon sera considéré comme positif si son taux d'expression du gène HER2 est supérieur au seuil de positivité calculé par la présente méthode.

**Méthode pour la détermination du seuil de positivité de la surexpression de la protéine
HER2 dans le cancer de sein et d'autres cancers.**

5 Domaine technique :

La présente invention concerne une méthode facile et pratique pour la détermination du seuil de positivité (threshold) pour la quantification de l'expression du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein, de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. La détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence se font par la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Un échantillon sera considéré comme positif si son taux d'expression du gène HER2 est supérieur au seuil de positivité calculé par la présente méthode.

Description de l'art antécédent

15 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).

20 Le gène HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) est localisé 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 par une amplification génique et son activation induit la prolifération des cellules tumorales, la stimulation de l'angiogénèse et la métastase.

25 L'Herceptin® est un anticorps monoclonal humanisé qui reconnaît spécifiquement le domaine extra-membranaire 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 ‘reference gene’ exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les cellules du corps et qui permettra la quantification exacte du gène cible. Cependant, l’utilisation d’un gène contrôle dont l’expression n’est pas stable entre les différents échantillons analysés affecte la validité des résultats.

La quantification de l’expression du gène HER2 par le présent kit se fait par la technique de la quantification relative ($\Delta\Delta Ct$) qui consiste en la comparaison de l’expression du gène cible par rapport à un gène control dans l’échantillon à analyser, et la normalisation de cette différence par rapport à l’expression des mêmes gènes dans un échantillon de calibration

(qui est dans notre cas un ARN issu de la lignée MCF7 et dont l'expression du gène HER2 est considérée comme référence) .

Malgré la grande stabilité de l'expression du gène cible (HER2) et des gènes de références dans l'ARN calibration issu des lignées MCF7, une fluctuation entre différents expériences
5 n'est pas toujours évitable, impliquant une nouvelle détermination du seuil de positivité (threshold) dont la valeur est liée à la différence entre l'expression du gène cible et les gènes de références dans l'échantillon de calibration. La présente invention consiste en une détermination mathématique facilitant le calcul du seuil de positivité dans chaque expérience et lors du changement du lot d'ARN MCF7 utilisé
10 comme calibrant pour la quantification relative des transcrits du gène HER2 dans le cancer de sein et d'autres cancers par la méthode de PCR en temps réel.

Exposé de l'invention.

La présente invention concerne une méthode pour la détermination du seuil de positivité
15 (threshold) pour la quantification de l'expression du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein, de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. La détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence se fait par l'intermédiaire de la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Un échantillon sera considéré comme positif si son taux
20 d'expression du gène HER2 est supérieur au seuil de positivité calculé par la présente méthode.

La méthode de détermination du seuil de positivité consiste en une équation mathématique permettant d'établir un nouveau seuil pour chaque expérience et pour chaque lot d'ARN de calibration, en se basant sur le résultat de la quantification du gène HER2 et des gènes de
25 référence dans l'échantillon de calibration (ARNm extrait des cellules MCF7).

En effet les méthodes antérieurs se basaient sur la courbe ROC pour la détermination de seuil de positivité, ce qui implique un nouveau calcul à chaque fois ou il ya une variation dans l'expression du gène HER2 et des gènes de référence dans l'échantillon de calibration. Ce calcul ne pouvant être effectué au niveau de l'utilisateur final du test de quantification des

transcrits d'HER2 et nécessite à chaque fois l'implication du fabricant afin d'intégrer cette modification dans cette procédure de calcul du seuil par la méthode du ROC

La présente invention améliore les autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet

5 a) Une grande précision des résultats grâce à l'utilisation d'un seuil de positivité adapté à chaque expérience

b) Un calcul facile du seuil de positivité qui peut être réalisé directement par l'utilisateur final du test de quantification des transcrits d'HER2 et ne nécessitant pas l'intervention du fabricant

10 c) Un calcul rapide du seuil de positivité par une équation mathématique au lieu de méthode ROC

Selon la présente invention, la détermination du seuil de positivité (threshold) pour la quantification de l'expression du gène HER2 se fait en différentes étapes

15 a) extraction des ARNs totaux des échantillons paraffinés ou frais et production de cDNA par transcription inverse b) quantification des transcrits par qPCR c) calcul du seuil de positivité par l'équation mathématique à partir des résultats de la ΔCT de l'échantillon de calibration (MCF7) d) quantification des transcrits du gène HER2 dans un échantillon donné par rapport à l'échantillon de calibration par la méthode de $\Delta\Delta CT$ e) comparaison de la quantité déterminée au seuil de positivité prédéterminé et identification de patients candidats pour un traitement à l'Herceptin®.

20

Le mot 'HER2' décrit dans la présente invention correspond au gène HER2

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

30 Le mot amplification de gène comme utilisé dans cette invention réfère à une ou plusieurs méthodes capables de copier un acide nucléique permettant ainsi une augmentation du nombre de copie d'une séquence d'acide nucléique cible. La séquence amplifiée peut être un acide desoxyribonucléique (ADN) ou un acide ribonucléique (ARN).

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

5

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

Le mot 'qPCR' (quantitative PCR ou real time RT-PCR) cité dans la présente invention réfère à une méthode de PCR permettant l'étude des produits de la réaction PCR durant les premières étapes d'amplification de l'ADN. La détection des produits de PCR se fait grâce à des sondes marquées à leurs extrémités 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), et à leurs extrémités 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. De ce fait, l'intensité du signal de la fluorescence mesurée au cours de la réaction d'amplification est proportionnelle au nombre de produits nouvellement formés (amplicons). La mesure en ADN ou ADNc se fait en logarithme. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par qPCR, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales.

Préférentiellement, dans la présente invention, la qPCR est réalisée en utilisant les sondes TaqMan avec un analyseur d'amplification comme ABI PRISM 7500HT 'sequence detection system' qui est un système de screening qui peut détecter et quantifier des acides nucléiques. La quantité de HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cite ci-dessus est calculée par le logiciel intégré dans le système ABI PRISM 7500HT en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$ ou de la courbe standard. Selon une autre caractéristique de la présente invention, le reporteur de la sonde peut être FAM, JOE, YAKYE YELLOW (YY) et le quencher BBQ, BHQ1, MGB1 ou TAMRA.

10 Le mot 'gène contrôle' ou 'gène de référence' représente un gène exprimé en général de façon similaire par toutes les cellules d'un organisme. Parmi les gènes contrôle, on trouve le RPL30, RPL37A et MRPL19.

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

Le mot multiplexe de la présente invention réfère à un essai qui se déroule simultanément avec au moins un autre essai. La qPCR en multiplexe reflète la détection et la quantification d'au moins 2 gènes dans un même tube de réaction. Par exemple, dans la présente invention, les 2 gènes HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cite ci-dessus sont détectés simultanément par qPCR.

Le mot 'échantillon test' comme utilisé dans la présente invention réfère à un échantillon de cellules gardé dans le paraffine ou autre méthodes de conservation, cellule fraîche, de cellules primaires, lignées cellulaires ou autre tissus et où des cellules utilisées pour une quantification des transcrits du gène HER2. L'échantillon test de la présente invention peut être d'origine humaine ou autre animal exprimant le gène HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cite ci-dessus qui peuvent être amplifié en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

Le mot efficacité de la réaction de la qPCR réfère au pourcentage des molécules d'ADN subissant une réplication à chaque cycle de PCR. Une efficacité de 100% reflète une réplication de toutes les molécules d'ADN cibles présent dans le milieu réactionnel après chaque cycle de PCR.

Le mot «threshold» ou seuil de quantification correspond à une quantité en dessous duquel l'échantillon est considéré négatif et au dessus duquel l'échantillon est considéré positif pour l'expression du gène HER2.

EXPERIENCES

5 Exemple 1. : Corrélation de la ΔCT du clibrateur MCF7 et le seuil de positivité (Figure 1).

La méthode $\Delta\Delta CT$ est bien établie dans la littérature comme une méthode de calcul de la quantité de l'expression d'un gène donné dans un échantillon par rapport à un autre considéré comme normalisateur ou de calibration (Litvak). La quantification des transcrits HER2 dans un échantillon est mesurée par rapport à l'échantillon de calibration qui est ici la lignée du cancer de sein MCF7 dont le taux d'expression du gène HER2 est normal. Pour se faire, la valeur CT du gène cible HER2 et du gène de référence PRL 30 est mesurée dans l'échantillon teste et la lignée MCF7 et la méthode $\Delta\Delta CT$ est calculée comme suivant

$$\Delta CT_{(\text{échantillon})} = CT_{\text{HER2}} - CT_{\text{RPL30}}$$

$$\Delta CT_{(\text{MCF7})} = CT_{\text{HER2}} - CT_{\text{RPL30}}$$

$$15 \quad \Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{échantillon})} - \Delta CT_{(\text{MCF7})}$$

$$\text{Quantité HER2}_{(\text{échantillon/MCF7})} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Pour chaque lot des lignée de cellule de MCF7 utilisée comme moyen de calibration le $\Delta CT_{(\text{MCF7})} = CT_{\text{HER2}} - CT_{\text{RPL30}}$ est calculé comme suivant

1-Extraction de l'ARNm totale cellulaire

20 L'extraction de l'ARN cellulaire se fait avec RNeasy mini kit de Qiagen suivant les recommandations du fournisseur (Qiagen Inc). La qualité du test est liée à la qualité de l'ARN initiale. De ce fait, le degré de la purification ainsi que la qualité de l'ARN sont analysés soit sur électrophorèse en gel d'agarose ou sur Bioanalyzer (Agilent).

2-Synthèse de l'ADNc par transcription inverse.

25 L'ADNc est obtenue à partir d'ARN total extrait d'échantillon test. La synthèse d'ADNc est réalisée à l'aide du Thermocycleur (Applied Biosystems) en utilisant le kit «RNA to cDNA Reverse Transcription» suivant les recommandations du fournisseur Applied Biosystems. En bref, dans un tube à essai et dans un volume final de 20 μ l, mélanger :

1-2 μ g de l'ARN (maximum 14.2 μ l total de l'ARN)

0.8 μ l de dNTP Mix (100mM)

2 μ l de 10X RT random primers

2 μ l de 10X RT Buffer

1 μ l de MultiScribe reverse transcriptase

5 Qsp Nuclease free H₂O 20 μ l

Mettre le milieu réactionnel dans un thermocycleur en utilisant les températures suivantes
25°C pour 10min

37°C pour 60 min

37°C pour 60 min

10 84°C pour 5s

4°C jusqu'à utilisation

3- La réaction de qPCR.

3a. Format simplex.

Il est réalisé dans un volume final de 25 μ l en mélangeant:

15 50 à 200ng de l'ADNc issu de la transcription inverse.

300 nM (2,5 μ l d'une solution mère de 3 μ M) de l'amorce « Forward » pour la détection des transcrits du gène HER2 et un autre pour la détection des transcrits du gène RPL30.

300 nM (2,5 μ l d'une solution mère de 3 μ M) de l'amorce « Reverse » pour la détection des transcrits du gène HER2 et un autre pour la détection des transcrits du gène RPL30.

20 200nM (2,5 μ l d'une solution mère de 2 μ M) de la Sonde TaqMan fluorescente pour la détection des transcrits du gène HER2 et une autre pour la détection des transcrits du gène RPL30.

12,5 µl du TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) contenant tous les éléments nécessaires pour la réalisation de la réaction de polymérisation à savoir l'enzyme ADN polymérase, les dNTPs et le tampon de la réaction avec des quantités optimales.

5 Mettre le milieu réactionnel dans une plaque 96 puits placée dans le thermocycleur permettant la réalisation de la réaction de PCR, la détection de la fluorescence libérée au cours de la réaction et la quantification du matériel amplifié (thermocycleur de type ABI PRISM 7500HT en est un exemple). Les cycles de température utilisés pour la réaction sont :

95°C pour 20s (1 cycle)

95°C pour 1s et 60°C pour 30s (50 cycles)

10 3b. Format multiplex (duplex).

Il est réalisé dans un volume final de 25µl en mélangeant:

50 à 200ng de l'ADNc issu de la transcription inverse.

300 nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de l'amorce « Forward » pour la détection des transcrits du gène HER2 et un autre pour la détection des transcrits du gène RPL30.

15 300 nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de l'amorce « Reverse » pour la détection des transcrits du gène HER2 et un autre pour la détection des transcrits du gène RPL30.

200nM (1,25 µl d'une solution mère de 4µM) de la Sonde TaqMan fluorescente pour la détection des transcrits du gène HER2 et 300nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de la Sonde TaqMan fluorescente pour la détection des transcrits du gène RPL30.

20 12,5 µl du TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) contenant tous les éléments nécessaires pour la réalisation de la réaction de polymérisation à savoir l'enzyme ADN polymérase, les dNTPs et le tampon de la réaction avec des quantités optimales.

25 Mettre le milieu réactionnel dans une plaque 96 puits placée dans le thermocycleur permettant la réalisation de la réaction de PCR, la détection de la fluorescence libérée au cours de la réaction et la quantification du matériel amplifié (thermocycleur de type ABI PRISM 7500HT en est un exemple). Les cycles de température utilisés pour la réaction sont :

95°C pour 20s (1 cycle)

95°C pour 1s et 60°C pour 30s (50 cycles)

Les valeurs CT pour le gène HER et le gène RPL30 sont déterminées à partir des courbes d'amplification obtenue après la PCR. Ainsi la $\Delta CT_{(MCF7)} = CT_{HER2} - CT_{RPL30}$ est calculé.

- 5 Pour chaque lot des cellules MCF7 une valeur $\Delta CT_{(MCF7)} = CT_{HER2} - CT_{RPL30}$ est calculé. Un seuil de positivité est calculé avec la méthode ROC pour chaque lot de MCF7. Les valeurs $\Delta CT_{(MCF7)} = CT_{HER2} - CT_{RPL30}$ sont ensuite représentées en fonction de la valeur du seuil de positivité. Les résultats de représentation sont décrits sur la figure 1.

Exemple 2. : Corrélation du seuil de positivité calculé expérimentalement celle calculé à

- 10 partir de l'équation mathématique .

Les valeurs seuil de plusieurs lots de calibration MCF7 ont été mesurées (comme décrit dans l'exemple 1) soit d'une façon expérimental en utilisant la méthode ROC (seuil expérimentale) ou bien en extrapolation à partir de la courbe $\Delta Ct = F(\text{seuil})$ décrite en haut (seuil mathématique). Les résultats sont représentés sur le tableau ci-dessous.

15

	HER2	RPL37	Ct	seuil expérimental	seuil mathématique
MCF7 1	26,44	19,25	7,19	30,05	30,9959
MCF7 2	24,62	18,04	6,58	18,38	19,0338
MCF7 3	27,89	19,84	8,05	48,91	47,8605
MCF7 4	23,75	17,01	6,74	22,53	22,1714
MCF7 5	18,2	10,68	7,52	37,26	37,4672
MCF7 6	25,1	17,18	7,92	46,53	45,3112
MCF7 7	22,37	16,12	6,25	13,62	12,5625
MCF7 8	23,75	17,01	6,74	22,53	22,1714
MCF7 9	27,3	19,49	7,81	43,11	43,1541
MCF7 10	25,84	19,28	6,56	18,13	18,6416
MCF7 11	24,71	18,33	6,38	16,00	15,1118
MCF7 12	25,26	18,68	6,58	19,38	19,0338
MCF7 13	22,37	16,12	6,25	12,62	12,5625
MCF7 15	24,5	18,12	6,38	15,00	15,1118

Revendications :

- 1) Méthode pour la détermination du seuil de la surexpression de la protéine HER2 dans le diagnostic du cancer de sein, de l'estomac et d'autres cancers utilisant la valeur $\Delta CT_{(calib)}$ de l'échantillon de calibration, la méthode comprend les étapes suivantes :
 - mesure de la valeur $\Delta CT_{(calib)}$ qui correspond à la différence entre la valeur Ct obtenue pour HER2 et celle obtenue pour un gène de référence Ct $\Delta CT_{(MCF7)} = CT_{HER2} - CT_{GR}$ par la technique PCR.
 - Représentation linéaire des valeurs $\Delta CT_{(calib)}$ en fonction du seuil selon la formule : $Y = 4.910X - 12.32$, ou Y est la valeur de seuil recherchée et X la valeur du $\Delta CT_{(calib)}$,
 - la valeur du seuil de la surexpression de la protéine HER2 est déduite de la courbe linéaire.
- 2) Méthode pour la détermination du seuil de la surexpression de la protéine HER2 selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'échantillon de calibration pourrait être de l'ARN synthétisé in vitro ou bien de l'ARNm extrait d'un échantillon de cellules cancéreuses ou non, exprimant normalement la protéine HER2.
- 3) Méthode pour la détermination du seuil de la surexpression de la protéine HER2 selon la revendication 1 caractérisée en ce que, les valeurs Ct sont mesurées pour un échantillon d'ARN ou d'ADN donné par la méthode PCR normale ou bien PCR quantitative (qPCR).

Δct (CT_{HER2} - CT_{RG})	4,72	4,92	4,79	5,1	4,84	4,48	4,01	3,89
Seuil	10,90	11,82	11,20	12,50	11,40	9,65	7,35	6,80

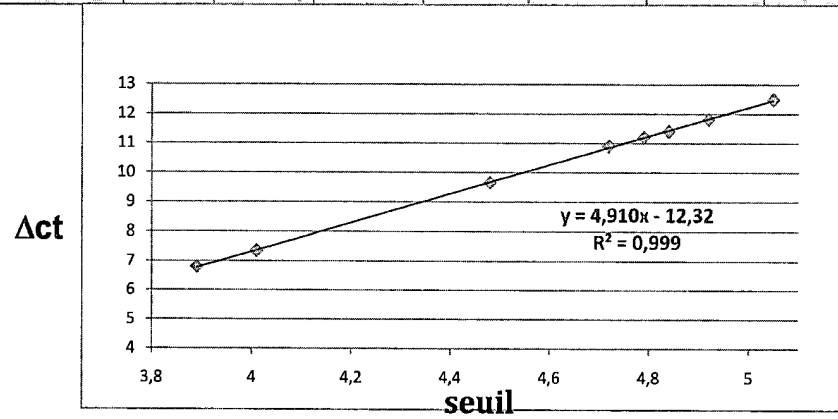


Fig.1

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE
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 telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 41742	Date de dépôt : 29/12/2017
Déposant : MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE, INNOVATION AND RESEARCH (MAScIR)	
Intitulé de l'invention : Méthode pour la détermination du seuil de positivité de la surexpression de la protéine HER2 dans le cancer de sein et d'autres cancers.	
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: A.MESLOHI	Date d'établissement du rapport : 20/07/2018
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
10 Pages
- Revendications
3
- Planches de dessin
1

Partie 2 : Rapport de recherche**Classement de l'objet de la demande :**

CIB : C12Q1/00

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
A	Place du test urinaire PCA3 pour le diagnostic du cancer de la prostate; V Vlaeminck-Guillem et al; Prog Urol, 2008, 18, 5, 259-265 Lien : https://www.urofrance.org/nc/science-et-recherche/base-bibliographique/article/html/place-du-test-urinaire-ipca3i-pour-le-diagnostic-du-cancer-de-la-prostate.html	1-3

***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 1-3	Oui
	Revendications Aucune	Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-3	Oui
	Revendications Aucune	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-3	Oui
	Revendications Aucune	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 : Place du test urinaire PCA3 pour le diagnostic du cancer de la prostate

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la revendication 1, d'où l'objet de ladite revendication est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13. Par la suite les revendications 2-3 dépendantes sont aussi nouvelles.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit un test PCA3 utilisé pour le diagnostic du cancer précoce de la prostate. La technique d'amplification quantitative en temps réel RT-PCR est utilisée. Concernant la détermination du seuil de positivité, une courbe ROC doit être établie.

La différence entre la revendication 1 et le document D1 réside en ce que le calcul du seuil de positivité se fait par une équation.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une autre méthode pour calculer le seuil de positivité pour la quantification de l'expression d'un gène.

La solution proposée par la présente demande implique une activité inventive. En effet, il n'existe pas d'incitation dans le document D1 qui permettra à l'homme du métier d'arriver à la méthode de détermination du seuil de positivité de la revendication 1 sans faire preuve d'esprit inventif.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-3 dépendent de la première revendication dont l'objet est considéré inventif pour les raisons énoncées ci-dessus, ainsi elles satisfont également, en tant que telles, aux exigences de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13 concernant l'activité inventive.

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.