

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 55256 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/70**
- (43) Date de publication : **28.06.2023**

-
- (21) N° Dépôt : **55256**
- (22) Date de Dépôt : **31.12.2021**
- (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 ; BALOUIRI MOUNYR**
- (74) Mandataire : **AMMANI Abdelhaq**

-
- (54) Titre : **Kit pour la détection différentielle des variants delta et Omicron du SARS-CoV-2.**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine du diagnostic médical. Elle concerne en particulier un kit de diagnostic moléculaire pour l'amplification et la détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 (Delta et Omicron) utilisant la technique de la RT-qPCR . Le kit selon l'invention se compose d'un set d'amorces et de sondes ciblant une région non mutée du gène S de la séquence originelle (Wuhan), d'un set d'amorces et de sondes ciblant des mutations spécifiques aux variants problématiques delta et Omicron, d'un set d'amorces et de sondes spécifiques du gène RPL37 qui sera utilisé comme contrôle interne (IPC). Cette amplification sera réalisée sur des échantillons et sur un vecteur plasmidique contenant des séquences nucléotidiques de chaque variant et de la séquence originelle (Wuhan).

Kit pour la détection différentielle des variants delta et Omicron du SARS-CoV-2.**Abrégé :**

La présente invention concerne le domaine du diagnostic médical. Elle concerne en particulier
5 un kit de diagnostic moléculaire pour l'amplification et la détection différentielle des variants
du virus SARS-CoV-2 (Delta et Omicron) utilisant la technique de la RT-qPCR . Le kit selon
l'invention se compose d'un set d'amorces et de sondes ciblant une région non mutée du gène
S de la séquence originelle (Wuhan), d'un set d'amorces et de sondes ciblant des mutations
spécifiques aux variants problématiques delta et Omicron, d'un set d'amorces et de sondes
10 spécifiques du gène RPL37 qui sera utilisé comme contrôle interne (IPC). Cette amplification
sera réalisée sur des échantillons et sur un vecteur plasmidique contenant des séquences
nucléotidiques de chaque variant et de la séquence originelle (Wuhan).

Kit pour la détection différentielle des variants delta et Omicron du SARS-CoV-2.

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne le domaine du diagnostic médical. Elle concerne en particulier
5 un kit de diagnostic moléculaire pour l'amplification et la détection différentielle des variants
du virus SARS-CoV-2 (Delta et Omicron) utilisant la technique de la RT-qPCR.

ART ANTERIEUR

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN qui appartient au genre des *Betacoronavirus* de la famille
10 des *Coronaviridae*. Ce virus hautement pathogène a été découvert en décembre 2019 dans la
ville de Wuhan (province de Hubei, en Chine).

Le SARS-CoV-2 est l'agent étiologique de la maladie à coronavirus 2019 (COVID 19)
(coronavirus disease 2019), qui se caractérise par une symptomatologie d'une infection
respiratoire à type de pneumonie de gravité variable, dont les symptômes sont de la fièvre (99
15 %), une asthénie (70 %), une toux sèche (59 %), une anorexie (40 %), des courbatures (35 %),
une dyspnée (31 %), une expectoration (27 %). Or, les symptômes peuvent s'aggraver avec un
syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) se développant dans 20 % des malades
dyspnéiques après un délai médian de 8 jours d'évolution. ([https://www.elsevier.com/fr-
fr/connect/aru/covid-19-diagnostic-therapeutique-urgences](https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/aru/covid-19-diagnostic-therapeutique-urgences))

20 Le 11 mars 2020, l'épidémie de Covid-19 est déclarée pandémie par l'OMS, qui recommande
des mesures de protection essentielles pour prévenir la saturation des services de soins intensifs
et pour renforcer l'hygiène préventive. En début novembre 2021, la barre tragique des cinq
millions de morts dans le monde entier a été franchie.

La contamination interhumaine par le virus SARS-CoV-2 se fait généralement par le biais de
25 gouttelettes de salive projetées lors de la toux, de l'éternuement, des postillons, de contact direct
avec la muqueuse oropharyngée, mais aussi par contact avec des surfaces contaminées.
([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333340/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-
Transmission_modes-2020.3-fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333340/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Transmission_modes-2020.3-fre.pdf))

En cas de suspicion de la COVID19, un test diagnostique du SARS-CoV-2 peut être effectué en plus de l'examen clinique et/ou en complément à des examens radiologiques approfondis (TDM, échographie ...).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0248866320301193>

5 Le test de référence pour le diagnostic de la COVID19 tel qu'il est recommandé par l'OMS est le test RT-QPCR qui détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 par la réaction en chaîne par polymérase après transcriptase inverse (RT-PCR, pour reverse transcription-polymerase chain reaction). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335724/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-fre.pdf>

10 Généralement, les gènes ciblés par les kits RT-qPCR utilisés par les laboratoires dans le monde pour la détection du SARS-CoV-2 sont : ORF1ab, le gène RdRp, le gène N (nucléoprotéine), le gène S (gène spike), le gène E (protéine de l'enveloppe), <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335724/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-fre.pdf>

15 Des tests rapides antigéniques basés sur l'immuno-détection des protéines du virus peuvent également être utilisés, surtout dans des logiques d'accélération du contact-tracing ou de dépistage vu que la sensibilité de ces tests est souvent mise en doute. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334409/WHO-2019-nCoV-Antigen_Detection-2020.1-fre.pdf)

20 La détection du SARS-CoV-2 par RT-QPCR peut être réalisée sur des échantillons biologiques obtenus par prélèvement nasal, salivaire, par lavage nasopharyngé ou broncho-alvéolaire. Sa sensibilité peut varier en fonction de la nature du prélèvement. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0248866320301193>

https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-12/synthese_rt-pcr_salivaire_sars-cov-2.pdf

25

Le programme de vaccination en masse contre la COVID 19 a démarré depuis décembre 2020. Après une année, on compte déjà sept vaccins ayant reçu l'autorisation d'utilisation d'urgence (Emergency Use Authorization) selon l'OMS et 8,5 milliards de doses de vaccin anti-Covid qui ont été administrées dans le monde. (<https://covid19.who.int/>)

Différentes approches technologiques ont été explorées pour l'élaboration des vaccins anti-COVID19. Des technologies dites de nouvelle génération, comme les vaccins à ARN ou les vaccins à vecteur viral, ont été favorisées. Des technologies plus traditionnelles comme les vaccins à virus inactivé ou de sous-unité protéique ont également été retenues.

5 <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>

Malgré les efforts déployés pour le développement des antiviraux anti SARS-CoV-2 depuis le début de la pandémie, aucun médicament n'a prouvé son efficacité quoique des effets bénéfiques de certaines molécules ont été observés chez certaines sous-populations.

10 <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>

Le virus SARS-CoV-2 est un virus à ARN simple brin de polarité positive d'environ 30 kilobases (Kb) avec une coiffe à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3'. Il renferme au moins 10 cadres ouverts de lecture ORFs (pour Open Reading frames), qui codent pour 16 protéines non structurales (nsp pour non structural protéines), 4 protéines

15 structurales et au moins 6 protéines auxiliaires.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02396-x>

Le premier ORF (ORF1ab) d'environ 20 Kb code pour deux polyprotéines chevauchantes pp1a et pp1ab et qui sont clivées par deux enzymes virales la papain-like-protease (PLpro ou nsp3) et la 3C-like-protease (3CLpro ou nsp5). L'action de ces deux protéases libèrent les douze

20 protéines non structurales qui jouent un rôle crucial dans la réplication et la transcription du SARS-CoV-2. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02396-x>

Parmi ces protéines non structurales, la nsp 12 ou ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) est une enzyme clé de la machinerie virale responsable de la transcription et la réplication vu qu'elle catalyse la synthèse de l'ARN génomique et des ARN subgénomiques du virus. Elle a

25 une structure globale similaire à celle du SARS-CoV.

Les quatre protéines structurales du SARS-CoV-2 contribuent à la structure et l'architecture de la particule virale. Il s'agit de la protéine de la couronne (S pour Spike protein), la glycoprotéine membranaire (MP pour Membrane glycoprotein), la protéine de l'enveloppe (E pour Enveloppe protein) et la protéine de la nuclécapside (N pour Nucleocapsid protein).

30 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02396-x>

La protéine S est une protéine de fusion de classe 1. Elle est d'une importance inédite vu qu'elle est la clé d'entrée du virus dans les cellules humaines par l'intermédiaire de son récepteur ACE2 (receptor angiotensin-converting enzyme 2). <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>

- 5 La protéine S est un homotrimère dont chaque monomère est subdivisée en deux sous unités S1 et S2. Le virus se fixe à son récepteur humain ACE2 via un site qui se situe dans le domaine RBD (pour récepteur binding domain) hébergé par la sous unité S1 de la protéine S. Alors que la sous unité S2 joue un rôle dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et l'internalisation du virus. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
- 10 La protéine S est hautement immunogène et héberge la majorité des épitopes virales et elle est aussi la principale cible des anticorps neutralisants. Il s'agit ainsi de la meilleure cible pour le développement des vaccins et des antiviraux.

Malheureusement depuis sa découverte, le SARS-CoV-2 subit des mutations qui s'accumulent dans son génome au fil des mois pour donner naissance à des variants inquiétants qui
15 continuent d'émerger encore plus rapidement et de faire hausser les chiffres, malgré les efforts déployés avec les vaccins. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.19.444774v1>

Le premier variant déclaré comme variant inquiétant (VOC pour Variant Of Concern) par l'OMS le 18 décembre 2020 est le variant alpha (ou B.1.1.7). Ce variant semble être apparu et/ou initialement répandu dans le sud-est de l'Angleterre. Il a été estimé que la transmission du
20 variant alpha était 50 à 100% plus élevée que tous les autres variants pendant son émergence. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.17.21260128v1.full.pdf>

Le variant alpha est associé à plusieurs mutations dans la protéine S, notamment la mutation S:N501Y et la délétion S:H69- et S :V70-. Mais aussi S:Y144- et S:P681H. Ce variant est aussi associé à une troncature au niveau ORF8:Q27* qui devient un codon stop, et d'autres mutations
25 N :D3L et N:S235F au niveau de la protéine N, et aussi la délétion au niveau de ORF1a(Nsp6) 3675-3677 aussi présente dans les variants beta et gamma. La délétion Δ 69/70 a été utilisée par certaines kit RT-PCR afin d'indiquer le variant alpha par un échec d'amplification de la cible S. Or avec l'apparition de cette délétion chez d'autres variants ce test a perdu sa fiabilité.

<https://covariants.org/variants/20I.Alpha.V1>

Depuis le 21 septembre 2021, le variant alpha est classé par le CDC américain (centers for disease control and prevention) comme variant surveillé (VBM pour Variants Being Monitored). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>

5 Le variant delta ou (B.1.617.2) a été détecté en premier en Inde, puis il s'est répandu rapidement dans le monde entier. Ce variant a été déclaré le 4 Avril 2021 par l'OMS comme variant d'intérêt (VOI Variant of Interest), puis le 11 mai 2021 comme un variant inquiétant (VOC).

Le variant delta est associé à plusieurs mutations dans la protéine S, notamment S:L452R, S:P681R, S:T19R, S:R158G, S:T478K, et S:D950N. Il est également associé à deux délétions S:E156- et S:F157- au niveau de la protéine S et deux délétions ORF8:D119- et ORF8:F120-
10 au niveau de l'ORF8. <https://covariants.org/variants/21A.Delta>

Les études épidémiologiques ont montré que le variant delta est plus transmissible que les autres variants avec un R0 au dessus de 7. [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(21\)00559-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(21)00559-2/fulltext)

15 De plus, le variant delta est moins sensible aux anticorps neutralisants que le variant alpha. Des chercheurs ont montré que des concentrations quatre fois plus élevées d'anticorps sont nécessaires pour neutraliser le variant delta par rapport à la souche alpha. Le Bamlavinimab un anticorps monoclonal anti-SARS-CoV-2 utilisé en clinique pour prévenir les formes graves de la maladie chez les personnes à risque a perdu son activité antivirale vis-à-vis du variant delta. <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03777-9>

20 Le variant Omicron (BA1 et BA2 ou B.1.1.529) a été déclaré le 26 novembre 2021 comme variant inquiétant (VOC) par l'OMS. Ce variant semble être apparu Dans l'Afrique de sud. Les premières séquences de ce variants ont été détectées au Botswana et l'Afrique de Sud.

Le variant Omicron comporte 32 mutations dans la protéine S. Certaines mutations sont déjà connues, notamment S:N501Y et la délétion S:H69-, S:V70- (retrouvées dans les séquences
25 du variant alpha), S:K417N (variant beta), S:A67V (variant Eta), S:H655Y et S:N679K (variant gamma), S:T95I et S:T478K (variant delta) ...

D'autres mutations sont apparues pour la première fois dans ce variant, notamment S:G339D, S:S371L, S:S373P, S:S375F, G446S, S:Q493R, S:G496S, S:Q498R, S:Y505H, S:T547K, S:N764K, S:D796Y, S:N856K, S:Q954H, S:N969K, S:L981F.

A la date de la rédaction de ce brevet, il y a une forte évidence que la transmissibilité très importante du variant Omicron par rapport à tous les autres variants et certaines spécialistes prévoient un R0 qui dépasse 10. [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(21\)00559-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(21)00559-2/fulltext)

- 5 Il existe peu d'évidence sur la sévérité de l'infection par le variant Omicron et le pourcentage de protection offert par les vaccins administrés, bien que certaines études montrent que ce variant peut compromettre les vaccins administrés et leur booster. [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(21\)00559-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(21)00559-2/fulltext)

10 Le kit de diagnostic TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel (Thermofisher) se base sur la détection de la délétion $\Delta 69/70$ par un échec d'amplification de la cible S. Or deux variants Omicron avec et sans la délétion 69/70 BA1 et BA1 respectivement, co-circulent aujourd'hui ce qui rend ce test inapproprié.

15 D'où l'intérêt de cette invention qui présente pour la première fois un kit de diagnostic moléculaire par RT-QPCR qui permet de détecter le virus du SARS-CoV-2 tout en différenciant les variants delta et Omicron. Cette invention est rendue possible via une combinaison de sets d'amorces et sondes permettant de détecter des mutations spécifiques de chaque variant par amplification des séquences mutées (et non pas échec d'amplification).

EXPOSE DE L'INVENTION

20 Le kit selon l'invention se compose d'un set d'amorces et de sondes ciblant une région non mutée du gène S de la séquence originelle (Wuhan), d'un set d'amorces et de sondes ciblant des mutations spécifiques aux variants problématiques delta et Omicron, d'un set d'amorces et de sondes spécifiques du gène RPL37 qui sera utilisé comme contrôle interne (IPC). Cette amplification sera réalisée sur des échantillons et sur un vecteur plasmidique contenant des
25 séquences nucléotidiques de chaque variant et de la séquence originelle (Wuhan).

Les mutations visées par le présent kit sont : S :L452R, S :G339D, S :S371L, S : S373P et S :S375P

30 Un set d'amorces amplifiant une région commune entre tous les variants est utilisé comme référence et conférant également à la technique une excellente sensibilité pour une application diagnostic.

Les sets d'amorces et de sondes de la région cible commune et des mutations caractéristiques de chaque variant ainsi que l'IPC seront utilisées en PCR en temps réel (qPCR) en format simplex ou multiplex pour une quantification fiable, rapide et moins couteuse.

5 De manière plus spécifique, la présente invention fait référence à un procédé d'amplification et de détection différentielle du virus SARS-CoV-2 et ses variants problématiques (VOC) delta et Omicron dans un échantillon de patient, en utilisant une nouvelle combinaison de sondes et d'amorces ciblant les différentes mutations spécifiques de chaque variants du virus SARS-CoV-2 et un IPC par les méthodes de RT-qPCR.

10 En plus des régions virales de chaque variant, le kit amplifie une autre séquence dite control interne positif de la réaction (IPC) qui est une région du gène RPL37 présente naturellement dans les cellules épithéliales. L'amplification de l'IPC permet de s'assurer du bon déroulement de toutes les étapes en amont de l'amplification par PCR. 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.

15 Le procédé de la présente invention représente une amélioration des autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet :

a) de détecter, à l'inverse des autres méthodes de l'art antérieur, dans la même réaction, une région non mutée du gène S la séquence originelle (Wuhan), des régions spécifiques aux variants problématiques delta et Omicron et différencier entre eux, et une région du gène RPL37
20 qui sera utilisée comme contrôle interne (IPC) endogène. Cela va permettre à la fois de détecter la présence du virus (par la détection de la région non mutée du gène S) et en même temps et par la même réaction, de détecter la présence des variants problématique delta et Omicron et différencier entre eux, évitant ainsi d'éventuelles manipulations et la consommation d'avantage de réactifs et de temps pour la détermination du variant présent dans l'échantillon.

25 b) à la différence des autres méthodes de l'art antérieur, mettre en évidence la présence de la mutation et ainsi la détermination du variant présent dans l'échantillon par la présence d'une courbe d'amplification spécifique à chaque variant, contrairement aux autres méthodes, qui font la conclusion de la présence de mutation par absence d'amplification. La méthode utilisée dans la présente invention permet ainsi de gagner en spécificité et en sensibilité, et d'avoir un résultat
30 diagnostic et épidémiologique plus probant.

c) d'utiliser un IPC correspondant à des séquences de gène RPL37, à la place des fragments d'ADN ou d'ARN qui, dans les kits disponibles, sont souvent ajoutées à l'échantillon à tester avant de procéder à l'extraction d'ARN, et retrouvées vers la fin de l'expérience dans l'étape d'analyse des courbes, témoignant du bon déroulement de toutes les étapes.

5 Selon la présente invention, la détection des transcrits des gènes cibles se font par la méthode RT-qPCR en différentes étapes :

a) conception et synthèse des nouvelles séquences nucléotidiques de sondes et d'amorces qui s'hybrident spécifiquement sur les régions cibles du virus et sur l'IPC.

b) le contrôle positif interne (IPC) consiste en une séquence spécifique du gène RPL37 présent
10 naturellement dans les cellules épithéliales et ainsi dans les échantillons à analyser

c) la détection de la présence du virus (par la détection de la région non mutée du gène S) et de la présence des variants problématique delta et Omicron (à travers la détection de mutations spécifiques) par le biais de courbes d'amplifications spécifiques à chaque séquence.

Selon une autre caractéristique de la présente invention, la séquence nucléotidique synthétisée
15 et qui va être clonée dans un plasmide bactérien et qui va servir de contrôle positif de l'expérience, a une séquence nucléotidique SEQ ID 01.

En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient les transcrits de la région non mutée du gène S, de la région spécifique du variant delta, et de la région spécifique du variant omicron, du virus SARS-CoV-2 dans un échantillon incluent :

20 a) un mélange de 3 amorces «forward» ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO 01-04-07-08-09 et un mélange de 3 amorces «reverse» ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO 02-05-10-11-12

b) Un mélange de 3 sondes «probe» permettant la détection de la région cible dans un échantillon ayant une séquence parmi les séquences : SEQ ID NO 3-6-13

25 En accord avec la présente invention, l'ensemble des amorces qui amplifient le transcrit de IPC dans un échantillon incluent :

a) une amorce «forward IPC» ayant une séquence: SEQ ID NO 14 et une des amorces «reverse IPC» ayant une séquence: SEQ ID NO 15

b) Une sonde «probe IPC» permettant la détection de l'IPC dans un échantillon ayant une séquence parmi les séquences: SEQ ID NO 16

La présente invention concerne aussi une méthode pour la détection des transcrits des régions cibles du virus SARS-CoV-2 et de l'IPC dans un même échantillon en simplex ou en multiplex. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes :

a) Extraction d'ARN à partir d'un échantillon par les méthodes de référence utilisées dans le domaine

b) Mettre l'ARN extrait en contact avec une amorce «forward cible», une amorce «reverse cible», une amorce «forward IPC» et une amorce «reverse IPC», dans des conditions d'amplification spécifiques pour générer une séquence cible,

c) détecter dans la même réaction l'amplification des différentes séquences cibles avec une sonde «probe cible» 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.

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

En accordance aussi avec cette invention, l'amplification des transcrits de la région cible et IPC de la présente invention peuvent se faire en format simplex ou multiplex.

.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un kit d'amplification et de détection différentielle du SARS-CoV-2 et de ses variants delta et omicron dans des échantillons, au moyen d'une nouvelle combinaison entre des sets d'amorces amplifiant des mutations spécifiques de chaque variant et la détection d'un control interne.

L'invention préconise aussi une méthode d'amplification et de détection différentielle du SARS-CoV-2 et de ses variants par PCR, qPCR ou RT-qPCR, des mutations spécifiques de

chaque variant et de l'IPC dans un échantillon en utilisant les sets d'amorces et sondes cités précédemment.

Le mot 'SARS-CoV-2' décrit dans la présente invention, représente le virus '*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*'.

- 5 Le mot 'gène S' décrit dans la présente invention, représente la région du génome du virus SARS-CoV-2 qui code pour la protéine spike.

Le mot 'gène N' décrit dans la présente invention, représente la région du génome du virus SARS-CoV-2 qui code pour la protéine de la nucléocapside.

- 10 Les mutations cibles sont spécifiques à chaque variant et qui ont été sélectionnées en se basant sur des études in silico que nous avons menées. Cette spécificité a fait d'elles des mutations de choix pour la sélection d'amorces utilisées lors de l'amplification différentielle de l'ARN des variants du SARS-CoV-2 par RT-qPCR permettant une excellente sensibilité et spécificité de la technique pour le diagnostic.

- 15 Le mot 'IPC' réfère à un gène de contrôle interne dont l'amplification au niveau d'un échantillon teste témoigne 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.

- 20 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/ou génome) 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 du virus SARS-CoV-2 dans un échantillon.

- 25 Le mot 'mutation' désigne une modification de la séquence d'ARN dans le génome du virus SARS-CoV-2 qui sont souvent ponctuelles et qui peuvent survenir par substitution délétion ou insertion.

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.

5 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).

10 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.

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.

15 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); 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
20 d'ADN. Les amorces vont ensuite se fixer spécifiquement sur l'ADN simple brin permettant ainsi à l'ADN polymérase de catalyser la polymérisation des dNTPs initiée à partir de l'extrémité 3' des amorces.

Le mot 'RT-qPCR' (reverse transcriptase-real time PCR) utilisé dans la présente invention représente une méthode de PCR en temps réel.

25 Le mot 'qPCR' (quantitative PCR ou real time 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
30 lorsqu'ils sont à proximité (10 nm). 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 par qPCR, est généralement dérivée de son C_T (cycle threshold). Le C_T dépend de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon 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 balises moléculaires « molecular beacons » et sondes hydrolysables « TaqMan » qui utilisent l'activité 5' exonucléase de l'enzyme Taq polymérase pour mesurer la quantité de la séquence d'ADN dans un échantillon.

Préférentiellement, la 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, CY5, HEX, VIC, JOE, YAKYE (YY) ou autres et le quencher BBQ, BHQ1, BHQ2, TAMRA ou autres.

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.

Le mot 'simplex' 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 RT-qPCR en simplex reflète la détection d'un seul gène ou une seule mutation dans un tube de réaction.

Le mot 'multiplex' 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 RT-qPCR en multiplex 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 mutations cibles, des gènes contrôles ou un gène et/ou mutation cible et un gène contrôle, qui peuvent être détectés simultanément par RT-qPCR.

Le mot 'échantillon' comme décrit dans la présente invention réfère à un fluide corporel, ce fluide peut être un prélèvement nasopharyngé, un prélèvement oropharyngé, un prélèvement salivaire, du sang, de l'urines ou des selles. L'échantillon peut aussi être d'origine humaine ou animale, comme il peut être de nature non biologique eau usée ou autre et qui peut être amplifié en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

EXEMPLES EXPERIMENTAUX

L'exemple 1

10 L'exemple 1 est illustré par la figure 1 qui représente un graphique des cycles de PCR en fonction du delta Rn, exemple d'un échantillon positif pour le SARS-CoV-2 variant delta.

L'exemple 2:

L'exemple 2 est illustré par la figure 2 qui représente un graphique des cycles de PCR en fonction du delta Rn, exemple d'un échantillon positif pour le SARS-CoV-2 variant omicron

15

EXPERIENCE :

Protocole de RT-qPCR de la présente invention pour la détection différentielle du virus SARS-CoV-2 et ses variants delta/omicron :

L'extraction de l'ARN à partir de l'échantillon a été faite par le kit **MagMAX Viral Pathogen Nucleic Acid Isolation** suivant les recommandations des fournisseurs.

Un set d'amorces sens, anti-sens et sonde correspondant à la séquence non mutée du gène S la séquence originelle (Wuhan), un set d'amorces et de sondes ciblant des mutations spécifiques aux variant problématique delta et Omicron, d'un set d'amorces et de sondes spécifiques du gène RPL37 correspondant à l'IPC sont ajoutés au master mix de la réaction qPCR, puis on ajoute 6,5µl d'ADNc de l'échantillon pour un volume réactionnel final de 10µl.

25

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

Dans le cas de 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.

5

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

Cible	Sens	Désignation	Séquence nucléotidique (5'-3')	SEQ ID
S non muté	F	S-F	AACTGCTCCTGCCATTTGTC	SEQ ID NO 1
	R	S-R	ACCAGTGTGTGCCATTTGAA	SEQ ID NO 2
	P	S-P	TGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGA	SEQ ID NO 3
S delta	F	DFsiM	TGGTGGTAATTATAATTACCG	SEQ ID NO 4
	R	DRsi	CCTTCAACACCATTACAAGG	SEQ ID NO 5
	P	DPsiR	CTACCGGCCTGATAGATTTTCAGTTGA	SEQ ID NO 6
S omicron	F	Fmut1	ACAAACTTGTGCCCTTTTGA	SEQ ID NO 7
		Fmutmis1	ACAAACTTGTGCCCTTTTAA	SEQ ID NO 8
		FmutLNA1	ACAAACTTGTGCCCTTTTAA	SEQ ID NO 9
	R	Rmut1	AAAGTGAAAAATGGTGCGAG	SEQ ID NO 10
		Rmutmis1	AAAGTGAAAAATGGTGCCAG	SEQ ID NO 11
		RmutLNA1	AAAGTGAAAAATGGTGCCAG	SEQ ID NO 12
P	Pcom1	CGCCACCAGATTTGCATCTGTTT	SEQ ID NO 13	
RPL37	F	IC-F	ACATGGCCAAACGTACCA	SEQ ID NO 14
	R	IC-R	TGCTGGCTGATTTCAATTTT	SEQ ID NO 15
	P	IC-P	CGGTAAATACGGGACCCGCTATG	SEQ ID NO 16

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

10

F= amorce forward

R= amorce reverse

P= sonde ou probe

Revendications

1. Procédé d'amplification et de détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 Delta et Omicron utilisant la technique de la PCR, qPCR ou RT qPCR, **caractérisé en ce qu'il comprend** les étapes suivantes :
 - a) le prélèvement et l'extraction d'un échantillon, qui peut être de nature biologique via un prélèvement nasal, salivaire, nasopharyngé, broncho-alvéolaire ou sanguin, aussi bien que de nature non biologique comme des eaux usées ;
 - b) le traitement de l'échantillon par :
 - L'utilisation de sondes et d'amorces avec un mélange réactionnel visant à la fois le variant Delta avec une mutation caractéristique, et le variant Omicron avec quatre mutations caractéristiques, augmentant ainsi la spécificité et la sensibilité du test, par rapport aux tests qui visent une seule mutation caractéristique ;
 - Et l'ajout d'un contrôle interne (IPC) endogène avec le mélange réactionnel correspondant à une séquence du gène RPL37, au lieu des fragments d'ADN ou d'ARN exogènes, permettant ainsi la détection, en plus de la séquence virale, des séquences du gène RPL37 qui sont naturellement présents dans le prélèvement des patients, et par la suite permet de réduire la quantité des consommables utilisés et gagner du temps en réduisant le nombre des étapes nécessaire à la réalisation du test ;
 - c) l'analyse des résultats.
2. Procédé d'amplification et de détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 Delta et Omicron utilisant la technique de la PCR, qPCR ou RT qPCR selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'ensemble des amorces qui amplifient les régions cibles du gène S du virus SARS-CoV-2 dans un échantillon biologique incluant :
 - Des amorces « forward cible » ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO01- SEQ ID NO04 - SEQ ID NO07 - SEQ ID NO08 - SEQ ID NO09 et des amorces « reverse cible » ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO02- SEQ ID NO05 - SEQ ID NO10 - SEQ ID NO11 - SEQ ID NO12 ;
 - Et des sondes « probe cible » permettant la détection de la région cible dans un échantillon biologique ayant une séquence parmi les séquences SEQ ID NO03 - SEQ ID NO06 - SEQ ID NO13.

3. Procédé d'amplification et de détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 Delta et Omicron utilisant la technique de la PCR, qPCR ou RT qPCR selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'ensemble des amorces qui amplifient le transcrit de IPC dans un échantillon biologique incluent :
 - Une amorce « forward IPC » ayant une séquence SEQ ID NO14 et une amorce « reverse IPC » ayant une séquence SEQ ID NO15 ;
 - Et une sonde « probe IPC » permettant la détection de l'IPC dans un échantillon biologique ayant une séquence SEQ ID NO16.
4. Procédé d'amplification et de détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 Delta et Omicron utilisant la technique de la PCR, qPCR ou RT qPCR selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** les amorces citées dans la revendication 3 peuvent contenir des modifications structurales LNA (« locked nucleic acid ») permettant d'augmenter la spécificité des amorces aux régions cibles.
5. Procédé d'amplification et de détection différentielle des variants du virus SARS-CoV-2 Delta et Omicron utilisant la technique de la PCR, qPCR ou RT qPCR selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'amplification des transcrits de la région cible et du contrôle interne IPC de la présente invention peut se faire en format simplex ou multiplex.

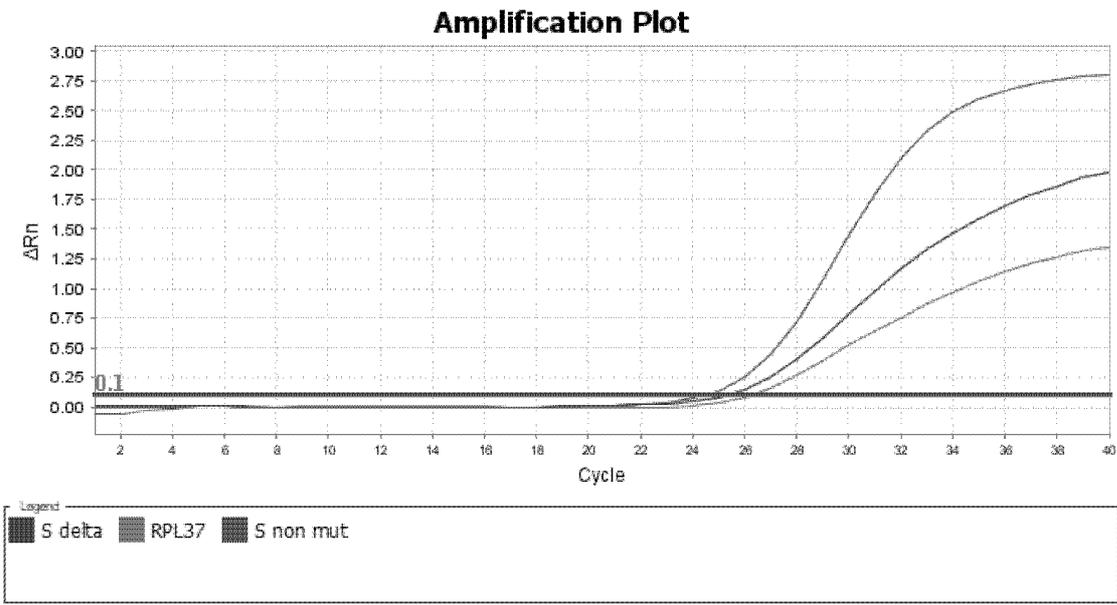


Fig.1

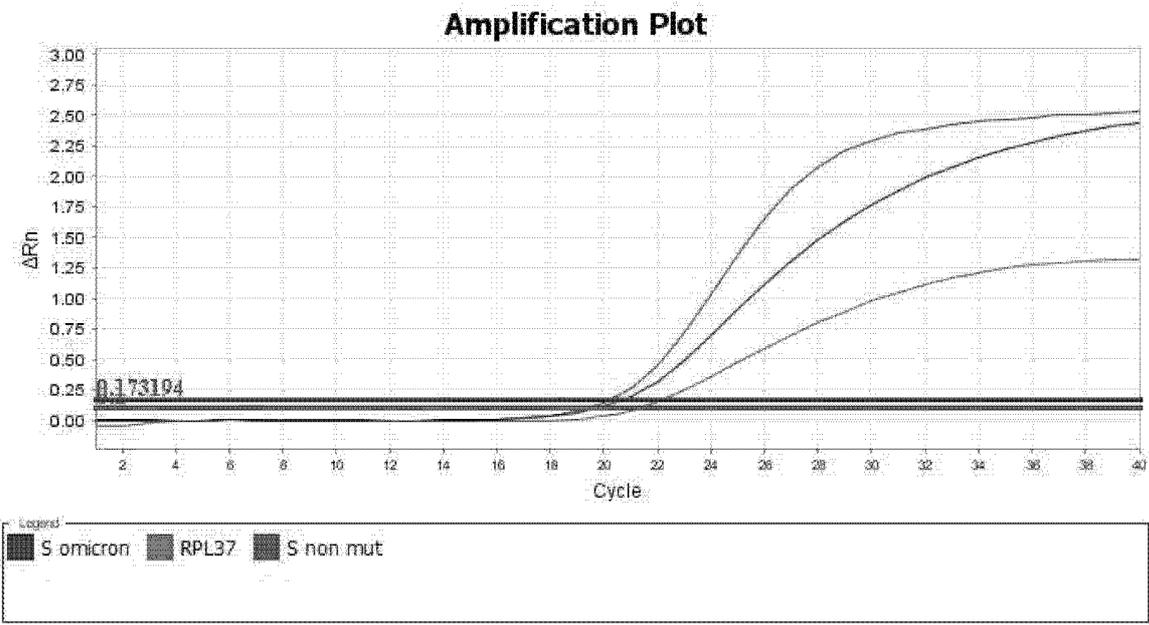
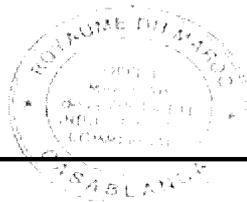


Fig.2

**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 : 55256	Date de dépôt : 31/12/2021
Déposant : Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR)	
Intitulé de l'invention : Kit pour la détection différentielle des variants delta et Omicron du SARS-CoV-2.	
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 forme et de clarté	
<input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 12/08/2022
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
13 Pages
- Revendications
5
- Planches de dessin
1 Page

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C12Q1/68 ; C12Q 1/70

CPC : C12Q1/6851, C12Q1/6806

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	A Novel Strategy for the Detection of SARS-CoV-2 Variants Based on Multiplex PCR-Mass Spectrometry Minisequencing Technology; Fei Zhao et al; 22/12/2021 DOI: 10.1128/Spectrum.01267-21	1-5
A	Dépistage rapide des variants du SRAS-CoV-2 préoccupants dans des échantillons cliniques et environnementaux à l'aide de tests RT-PCR imbriqués ciblant les mutations clés de la protéine de pointe ; G La Rosa et al ; 01/06/2021 DOI: 10.1016/j.watres.2021.117104 ;	1-5
A	CN113215313A ; SHANDONG LAIBO BIOTECHNOLOGY CO LTD ;06/08/2021	1-5
A	WO2021224269A2 ; MULTIPLEXDX SRO [SK] ; 11/11/2021	1-5

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

Nouveauté	Revendications 1-5 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications 1-5 Revendications aucune	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-5 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 : A Novel Strategy for the Detection of SARS-CoV-2 Variants Based on Multiplex PCR-Mass Spectrometry Minisequencing

D2 : Dépistage rapide des variants du SRAS-CoV-2 préoccupants dans des échantillons cliniques et environnementaux à l'aide de tests RT-PCR imbriqués ciblant les mutations clés de la protéine de pointe

1. Nouveauté

Aucun des documents de l'art antérieur cité ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-5 de la présente invention. Par conséquent, l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'état de l'art le plus proche de l'objet des revendications 1-5 de la présente invention. Il divulgue une méthode pour la détection des variants du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) à l'aide de la technique de mini-séquençage par spectrométrie de masse PCR multiplex.

L'objet de la présente invention diffère du document D1 par la combinaison de nouvelles amorces et sondes pour le développement d'un procédé la détection des deux variants Delta et Omicron du SARS-CoV-2.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre est donc considéré comme la fourniture d'un nouveau procédé d'amplification et de détection différentielle des deux variants Delta et Omicron du virus SARS-CoV-2 en utilisant une nouvelle combinaison de sondes et d'amorces ciblant les différentes mutations spécifiques de chaque variant.

La solution proposée dans la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes :

Aucun des documents de l'art antérieur cité ci-dessus ne suggère les séquences spécifiques

des amorces et des sondes comme revendiquées dans la présente invention pour la détection des deux variants du virus Delta et Omicron, en effet, il était clairement démontré par le déposant que le choix d'une telle combinaison d'amorces et de sondes présente une amélioration en terme de spécificité et de sensibilité ainsi qu'un résultat diagnostique plus probant.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-5 implique pas une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

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.