

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11) N° de publication : **2 921 064**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : **07 57598**

51) Int Cl<sup>8</sup> : **C 07 H 21/00 (2006.01), C 12 N 15/40, C 12 Q 1/68**

12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 14.09.07.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 20.03.09 Bulletin 09/12.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : *BIOMERIEUX Société anonyme — FR.*

72) Inventeur(s) : TELLES JEAN NOEL.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) :

54) OLIGONUCLEOTIDES, UTILISATION, METHODE DE DETECTION ET KIT PERMETTANT DE DIAGNOSTIQUER LA PRESENCE DU GENE E1 DU VIRUS DU CHIKUNGUNYA.

57) La présente invention concerne des oligonucléotides destinés à permettre l'amplification et la détection d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du virus du Chikungunya.

Ces oligonucléotides ont une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides et comprennent au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus des séquences suivantes:

SEQ ID No. 1: 5'-CTCTTACCGGGTTTGTTC-3'

SEQ ID No. 2: 5'-GCCTGGACACCTTTGAC-3'

ou leur séquence complémentaire.

L'invention concerne également l'oligonucléotide permettant la détection des amplicons, l'utilisation de ces oligonucléotides, une méthode de détection et un kit permettant de diagnostiquer la présence du gène E1 du virus du Chikungunya.

L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.

FR 2 921 064 - A1



**Oligonucléotides, utilisation, méthode de détection et kit permettant de diagnostiquer la présence du gène E1 du virus du Chikungunya.**

5 La présente invention concerne des oligonucléotides destinés à permettre l'amplification et la détection d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du virus du Chikungunya. L'invention concerne également l'utilisation de ces oligonucléotides, une méthode de détection et un kit  
10 permettant de diagnostiquer la présence du gène E1 du virus du Chikungunya.

Le virus Chikungunya est un arbovirus du genre alphavirus qui se transmet par des moustiques Aedes. Il a  
15 été isolé pour la première fois en 1953. Depuis, des épidémies de Chikungunya ont eu lieu en Afrique tropicale et en Asie. Une épidémie sans précédent a eu cours sur l'Ile de La Réunion, qui compte 775 000 habitants et pour laquelle plus de 244 000 cas ont été rapportés au 20 avril 2006.

20

A l'heure actuelle, il n'existe pas de diagnostic de routine de l'infection par Chikungunya et très peu de laboratoires ont la capacité de diagnostiquer ce virus. Les techniques employées dans ces laboratoires de référence sont  
25 les suivantes :

- sérologie par des techniques courantes (inhibition de l'hémagglutination, fixation du complément, immunofluorescence, Elisa),
- amplification et détection par RT-PCR en temps  
30 réel.

La sérologie repose sur la détection d'anticorps IgM et IgG qui apparaissent à différents moments de l'infection. Les

IgM sont détectées dans le sérum en moyenne 5 jours après le début des signes cliniques et persistent plusieurs semaines à trois mois. Les IgG sont identifiés par deux prélèvements (phase aiguë et convalescence), et persistent pendant des années.

La sensibilité et la spécificité, de ces tests ne sont pas bien établies, notamment la possibilité de faux positifs par réactions croisées avec les IgM de la dengue ou d'autres arbovirus.

En parallèle des tests d'amplification par RT-PCR en temps réel ont été mis au point. L'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des maladies infectieuses est bien connues. Elle permet en effet une détection rapide du génome du virus et ceci dès la phase initiale virémique qui correspond au sept premier jours dans le cas d'une infection par le virus du Chikungunya.

Ainsi, Pastorino *et al* décrivent un test RT-PCR pour la détection en temps réel du virus Chikungunya en utilisant la méthode TaqMan® (Journal of Virological Methods, 124 (2005) 65-71). Les amorces d'amplification et la sonde de détection ont été sélectionnées dans la région du gène de la protéine structurale E1. La sensibilité obtenue est de  $1,2 \cdot 10^{-2}$  Dose Infectieuse par réaction. Dans une autre publication, Parida *et al* décrivent la détection du virus Chikungunya par une méthode alternative à la PCR nommée RT-LAMP pour «reverse transcription loop-mediated isothermal amplification» (J. Clin. Microbiol. 2007 Feb; 45(2):351-7). Les amorces ont été sélectionnées dans le gène de la protéine E1. Une sensibilité de 20 copies de transcrits par réaction a été déterminée.

L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite 6 amorces différents pour effectuer la réaction

d'amplification. De plus, la détection n'est pas effectuée avec une sonde spécifique mais par turbimétrie. Ainsi, dans le cas où la réaction n'est pas spécifique et un autre virus est amplifié, un faux positif sera détecté.

5       Ainsi, un test d'identification du virus du Chikungunya, rapide, spécifique et très sensible est toujours attendu.

La présente invention concerne donc une paire  
10 d'oligonucléotides destinée à permettre l'amplification d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya, la paire d'oligonucléotides consistant en :

- un premier oligonucléotide d'une longueur comprise  
15 entre 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 1 : 5'-CTCTTACCGGTTTGTTC-3', ou sa séquence complémentaire, et

- un second oligonucléotide d'une longueur comprise entre  
20 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 2 : 5'-GCCTGGACACCTTTCGAC-3', ou sa séquence complémentaire.

25       Dans un mode particulier de l'invention, le premier oligonucléotide comprend additionally une séquence promotrice qui peut être reconnue par une enzyme ARN polymérase ADN dépendante. De préférence, la séquence promotrice qui peut être reconnue par une enzyme ARN  
30 polymérase ADN dépendante est une polymérase T7.

Ainsi, lorsque cet oligonucléotide, auquel est additionnée la séquence promotrice, permet l'amplification

de la séquence cible localisée dans le gène E1, il consiste essentiellement en la séquence suivante :

SEQ ID No. 3 : 5'-  
ATTCTAATACGACTCACTATAGGGGCTCTTACCGGGTTTGTGC-3'. La partie

5 de la séquence en italique correspond à la séquence promotrice T7. La séquence soulignée correspond à une séquence créant un espace, dite linker, entre la séquence promotrice et l'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 1.

10 L'invention concerne également un oligonucléotide destiné à être utilisé comme sonde de détection d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya, la sonde de détection étant d'une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins  
15 un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 4 : 5'-CTCTCAGGCACCATCTGGC-3', ou sa séquence complémentaire, ladite séquence comportant au moins un moyen de marquage.

20 Dans un mode de réalisation intéressant de l'invention, l'oligonucléotide utilisé comme sonde de détection permet une détection en temps réelle et est encadré de deux bras, l'un en position 5' et l'autre en position 3' dudit oligonucléotide, chaque bras ayant une longueur comprise  
25 entre 5 et 15 nucléotides, préférentiellement comprise entre 6 et 10 nucléotides et ces bras étant complémentaires l'un de l'autre afin de présenter l'oligonucléotide sous forme d'une boucle en l'absence de la séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya.

30

Dans un mode encore plus avantageux, la sonde de détection comporte un marqueur fluorescent à l'extrémité

libre d'un des bras et un absorbeur de fluorescence à l'extrémité libre de l'autre bras. De préférence, la sonde de détection est constituée par un « molecular beacon », appelé par la suite balise moléculaire. Les balises moléculaires sont des sondes de détection sous forme d'oligonucléotides simple brin, qui ont une structure en tige et boucle (stem loop structure) bien connue de l'homme du métier. La boucle contient une séquence sonde complémentaire de la séquence cible (amplicon en général), et la tige est formée par l'hybridation de deux séquences formant des bras, qui sont localisées chacune à chaque extrémité de la sonde. Un fluorophore est lié de façon covalente à l'extrémité d'un des deux bras et un absorbeur de fluorescence (quencher) est lié de façon covalente à l'extrémité de l'autre bras. Les balises moléculaires ne fluorescent pas lorsqu'elles sont libres en solution, la structure boucle maintenant le fluorophore et l'absorbeur à proximité l'un de l'autre, ce qui entraîne le transfert de la fluorescence du fluorophore vers l'absorbeur. Ledit absorbeur de fluorescence est un chromophore non fluorescent qui dissipe l'énergie reçue du fluorophore en chaleur. Cependant, en présence d'amplicons complémentaires, quand elles s'hybrident à ces cibles, elles subissent un changement conformationnel qui leur permet de fluorescer. Dans ce cas, il y a formation d'un hybride sonde-cible qui est plus long et plus stable que l'hybride créé par les deux bras de la tige. La rigidité et la longueur de l'hybride sonde-hybride empêchent l'existence simultanément de l'hybride tige. En conséquence, la balise moléculaire subit une réorganisation conformationnelle spontanée qui force l'hybride tige à se dissocier et le fluorophore et l'absorbeur à s'éloigner l'un de l'autre, ce qui restaure la

fluorescence.

Plus précisément la sonde de détection est constituée par une balise moléculaire préférentiellement constituée par :

5 SEQ ID No. 5 : 5'-[6-FAM]-*CGAGCGACTCTCAGGCACCATCTGGCTCGCTCG*-[DabSyl]-3', ou sa séquence complémentaire. La séquence en italique correspond aux bras mentionnés ci-dessus, constituant la tige.

10

Selon la présente invention, les deux oligonucléotides destinés à être utilisés comme amorces d'amplification, et l'oligonucléotide destiné à être utilisé comme sonde de détection, ont chacun une longueur comprise entre 10 et 50  
15 nucléotides et comprennent au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus des séquences SEQ ID No. 2 et 4 respectivement. De préférence, chaque oligonucléotide est d'une longueur comprise entre 12 et 30 nucléotides et comprend au moins un fragment de 10 ou 12 nucléotides  
20 consécutifs, et encore plus préférentiellement, chaque oligonucléotide a une longueur comprise entre 15 et 26 nucléotides et comprend au moins un fragment de 10, 12 ou 15 nucléotides.

25

La présente invention propose aussi l'utilisation de la paire d'oligonucléotides ou de la sonde tels que décrits précédemment, dans une réaction d'amplification d'acides nucléiques du génome du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon biologique.

30

L'invention concerne encore une méthode de détection d'acides nucléiques du virus du Chikungunya susceptible

d'être présents dans un échantillon, dans laquelle l'échantillon est soumis à une réaction d'amplification d'acides nucléiques utilisant une paire d'oligonucléotides, telle que décrite précédemment, en présence des réactifs d'amplification nécessaires à une telle amplification et où la présence d'amplicons d'intérêt est détectée.

Cette méthode de détection peut être basée sur une réaction d'amplification RT-PCR.

Alternativement, cette méthode de détection peut être basée sur une technique d'amplification transcriptionnelle.

Préférentiellement cette technique est la technique NASBA. La technique NASBA est une méthode d'amplification isotherme d'acides nucléiques faisant intervenir plusieurs activités enzymatiques, qui permet une détection rapide du virus Chikungunya. L'amplification d'acides nucléiques par cette voie convient bien aux génomes à ARN, grâce à la présence d'une étape de transcription inverse directement dans la réaction d'amplification.

Ainsi, l'invention concerne aussi une méthode d'amplification du gène E1 du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- incuber l'échantillon dans un tampon d'amplification en présence de deux amorces d'amplification, chacune ayant une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides, l'une comprenant additionnellement une séquence promotrice, l'autre de polarité opposée à l'amorce associée à la séquence promotrice, pour s'hybrider respectivement en amont et en aval d'une zone d'intérêt localisée dans le gène E1 du virus du Chikungunya,
- ajouter les réactifs suivants dans l'échantillon:

- une enzyme ayant une activité RNA dépendant DNA polymérase,
  - une enzyme ayant une activité DNA dépendant DNA polymérase,
  - 5       • une enzyme ayant une activité RNase H,
  - une enzyme ayant une activité DNA dépendant RNA polymérase, et
- maintenir le mélange réactionnel ainsi créé sous des conditions appropriées et pendant une durée de temps
- 10       suffisante pour qu'une amplification ait lieu.

Les enzymes ci-dessus énumérées sont au nombre de quatre mais il est tout à fait possible de recourir à une enzyme ayant deux voir trois des activités ci-dessus mentionnées,

15 dans ce cas l'utilisation de trois voir de deux enzymes reste possible et couverte par l'invention. De plus, d'autres éléments sont nécessaires à l'établissement d'une amplification tels que des nucléotides ou encore des solutions tampon. Ces solutions tampon peuvent être

20 optimisées en fonction de la technique d'amplification utilisée ou des oligonucléotides présents dans la réaction. Dans une réaction d'amplification transcriptionnelle, telle qu'une réaction NASBA, ces solutions tampon peuvent

25 contenir, par exemple du DMSO qui améliore la réaction d'amplification (tels que décrit dans le document PCT/US90/04733). De plus, il est également possible d'ajouter à la réaction d'amplification un contrôle interne, afin d'éviter la présence de faux négatif due à l'échec du procédé d'amplification. L'utilisation d'un contrôle interne

30 dans une réaction d'amplification transcriptionnelle est décrite dans le document PCT/EP93/02248. Un tel contrôle interne est sélectionné de telle manière qu'il ne rentre pas

en compétition avec l'acide nucléique cible dans la réaction d'amplification. Tous ces éléments sont bien connus de l'homme du métier.

5 Enfin l'invention propose un kit de détection du gène E1 du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon, contenant

- au moins une paire d'oligonucléotides telle que décrite précédemment pour réaliser l'amplification du gène E1,
- 10 - au moins un oligonucléotide marqué ou pouvant être marqué, tel que décrit précédemment, et ayant une séquence d'acide nucléique substantiellement complémentaire avec au moins une partie de la séquence d'acide nucléique amplifiée,
- 15 - des réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification.

De préférence, les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification sont des réactifs  
20 permettant une amplification NASBA.

Par « substantiellement complémentaire » on entend qu'une hybridation est réalisée entre un oligonucléotide marqué ou pouvant être marqué, autrement appelé amorce  
25 d'amplification ou sonde de détection, et au moins une partie de la séquence d'acide nucléique cible ou amplifiée dite amplicon, cette hybridation étant spécifique et sélective pour permettre l'amplification ou la détection de l'amplicon d'intérêt.

30 Par « marqueur détectable », on entend au moins un marqueur capable de générer directement un signal détectable. Par exemple la présence de biotine est considéré

comme un marquage direct, car elle est détectable, même s'il est possible de l'associer ultérieurement avec de la streptavidine marquée. Une liste non limitative de ces marqueurs suit :

- 5 • les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- 10 • les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leur propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, l'impédance,
- 15 • les groupements détectables, par exemple dont les molécules sont de tailles suffisantes pour induire des modifications détectables de leurs caractéristiques physiques et/ou chimiques, cette détection peut être réalisée par des méthodes optiques comme la diffraction,
- 20 la résonance plasmon de surface, la variation de surface, la variation d'angle de contact ou des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel,
- les molécules radioactives comme le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou le  $^{125}\text{I}$ .

25 Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention le marqueur est détectable électrochimiquement, et en particulier le marqueur est un dérivé d'un complexe de fer, comme un ferrocène.

30 Le terme « acide nucléique » signifie un enchaînement d'au moins deux désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié,

par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée, telle que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre  
5 base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkyl-phosphonates, au niveau du squelette comme par exemple les alpha-oligonucléotides ( FR  
10 2 607 507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992 ou les 2' O-alkyl ribose et les LNA (BW, Sun et al., Biochemistry, 4160-4169, 43, 2004). L'acide nucléique peut être naturel ou synthétique, un oligonucléotide, un polynucléotide, un fragment d'acide  
15 nucléique, un ARN ribosomique, un ARN messager, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique telle que :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, et sa  
20 dérivée RT-PCR (Reverse Transcription PCR), notamment dans un format en une étape, tel que décrit dans le brevet EP-B-0.569.272,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184,
- 25 • RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la  
30 demande de brevet WO-A-91/02818,
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491, et

- RCA (Rolling Circle Amplification (US-6,576,448)).

On parle alors d'amplicons pour désigner les acides nucléiques générés par une technique d'amplification enzymatique.

5 Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison.

Les étapes d'amplification et de détection ci-dessus exposées peuvent être précédées par une étape de purification. Par « étape de purification », on entend  
10 notamment la séparation entre les acides nucléiques des micro-organismes et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse qui précède la purification des acides nucléiques. Ces étapes de lyse sont bien connues à titre d'exemple indicatif, on peut utiliser les méthodes de lyse  
15 telles que décrites dans les demandes de brevet :

- WO-A-00/60049 sur la lyse par sonication,
- WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,
- WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et
- WO-A-99/15621 sur la lyse mécanique.

20 L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les traitements par des agents chaotropiques, tels que les sels de guanidium (brevet US-A-5,234,809).

Cette étape permet généralement de concentrer les acides  
25 nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des supports solides, tels que des particules magnétiques (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques, qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette  
30 étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de

réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut  
5 tous les matériaux sur lesquels peut être fixé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides, tels que les matériaux à base de cellulose,  
10 par exemple du papier, des dérivés de cellulose, tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques, telles que le nylon ;  
15 des matériaux minéraux, tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels, etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane, d'une particule ou d'une  
20 plaque sensiblement plane de verre ou silicium ou dérivés.

On peut réaliser l'ensemble du protocole (de l'échantillon prélevé à la détection des amplicons) dans un seul et même récipient ou tube, traité manuellement ou dans un automate.  
25

Les figures et l'exemple ci-joints représentent un mode particulier de réalisation et ne peuvent pas être considérés comme limitant la portée de la présente invention.

Figures 1 à 8 : Détection du virus de Chikungunya à  
30 différentes concentrations en unité de fluorescence relative (RFU en ordonnées) par unité de temps (T en abscisse). La courbe en pointillé correspond au signal émis par la sonde

complémentaire selon l'invention d'une séquence du virus du Chikungunya et la courbe en trait plein correspond au contrôle interne, celui-ci étant un transcript synthétique d'une taille d'environ 1000 bases qui englobe la région  
 5 amplifiée par les primers NASBA ; Il sera donc co-amplifié avec la séquence sauvage présente dans l'échantillon. Cependant ce contrôle interne a été modifié de façon à remplacer la région où se fixe normalement la sonde de détection par une séquence ne correspondant pas au  
 10 Chikungunya. Cette région modifiée est reconnue par la sonde de détection du contrôle interne.

Figure 1 : plasma négatif.

Figure 2 : plasma positif, 4.18 copies/ml

Figure 3 : plasma positif, 41.8 copies/ml

15 Figure 4 : plasma positif, 418 copies/ml

Figure 5 : plasma positif, 4180 copies/ml

Figure 6 : plasma positif, 41800 copies/ml

Figure 7 : plasma positif, 418000 copies/ml

Figure 8 : plasma positif, 4180000 copies/ml

20

**Exemple 1 : Expérience d'évaluation des amorces et de la sonde de détection du virus du chikungunya sur un ARN provenant d'échantillon clinique de la Réunion :**

25 Les séquences de la paire d'oligonucléotide (P1 et P2) et la sonde de détection (MB) présente sous forme de balise moléculaire, sont indiqués ci-dessous :

Séquences des amorces et sonde utilisées :

30 **P1, SEQ ID NO.3 :**

5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGCTCTTACCGGGTTTGTTC -3'

**P2, SEQ ID NO.2 :** 5'- GCCTGGACACCTTTCGAC -3'

**MB, SEQ ID NO.5 :** 5'-CGAGCGACTCTCAGGCACCATCTGGCTCGCTCG-3'

La séquence indiquée en gras et en italique correspond à la séquence promotrice T7, reconnue par l'ARN polymérase T7 et est retrouvée dans les oligonucléotides P1 pour la mise en œuvre de la technique NASBA. La séquence soulignée correspond à une séquence créant un espace, dite linker, entre la séquence promotrice et l'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 1.

10

Protocole opératoire :

- Source du virus Chikungunya :

Dilutions de plasmas de patients infectés et quantifiés, provenant du Centre Hospitalier Sud St Denis La Réunion.

15

- Extraction des acides nucléique :

Les acides nucléiques ont été extraits en utilisant le Système easyMAG (bioMérieux B.V., Boxtel, Hollande) avec les réactifs NucliSENS Magnetic Extraction Reagents (bioMérieux B.V., Boxtel, Hollande, NucliSENS EasyMAG extraction Tampon 1 #280130, NucliSENS EasyMAG extraction Tampon 2 #280131, NucliSENS EasyMAG extraction Tampon 3 #280132, NucliSENS EasyMAG Silice Magnétique #280133, NucliSENS EasyMAG tampon lyse #280134). Les extractions ont été faite sur 200 µl de chacune des dilutions de plasma. Les dilutions correspondent à des concentrations de 41 copies/ml, 418 copies/ml, 4180 copies/ml, 41800 copies/ml, 418000 copies/ml, 4180000 copies/ml.

25

30 - Amplification/Détection :

Selon les instructions du kit NucliSENS EasyQ Basic Kit V2 (bioMérieux B.V., Boxtel, Hollande), un mélange réactionnel

unique permettant la détection simultanée du gène E1 du Chikungunya et du contrôle interne est préparé. Brièvement, à 64 µl de diluant ont été ajoutés 11 µl d'eau, 13 µl de KCl à 1,2 M, 4 µl de chacun des oligonucleotides à 10 µM, et 0,8 µl de chacune des balises moléculaires à 20 µM (1 balise moléculaire spécifique de Chikungunya et une sonde spécifique du contrôle interne). Un volume de 10 µl du mélange a ensuite été ajouté à 5 µl des solutions des ARNs précédemment extraits.

10

### Résultats :

Les résultats sont visibles sur les figures 1 à 8 et montrent que le test fonctionne et détecte un plasma Chikungunya positif jusqu'à la concentration 4180 copies/ml (équivalent à environ 150 copies d'ARN de Chikungunya/réaction NASBA). On observe que plus le nombre de copies d'ARN de Chikungunya est élevé, plus l'amplitude de la courbe est grande.

20

Les résultats montrent aussi que le contrôle interne est correctement détecté et joue bien son rôle de validation de l'essai. Le signal du contrôle interne diminue proportionnellement au nombre de copies d'ARN de Chikungunya. Le signal du contrôle interne est à son maximal dans le plasma négatif, et est minimal en présence d'un fort nombre de copies d'ARN Chikungunya. En effet, étant donné qu'il s'agit d'une co-amplification, la quantité du contrôle interne a été calculée de façon à ce que le contrôle interne ne rentre pas trop en compétition avec la séquence sauvage du virus. Ainsi, le contrôle interne est normalement amplifié quand il est seul (échantillon négatif), mais dès qu'une séquence sauvage du Chikungunya est présente, c'est l'amplification de cette séquence qui a lieu jusqu'à

30

complète inhibition de l'amplification du contrôle interne quand la séquence sauvage est présente à forte concentration. Ainsi pour que le test soit validé, il doit toujours y avoir un signal : si l'échantillon est négatif on a le contrôle interne positif, si l'échantillon est positif on a un signal positif avec ou non un signal pour le contrôle interne (selon si l'échantillon est fortement positif ou non).

**REVENDICATIONS**

1. Paire d'oligonucléotides destinée à permettre l'amplification d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya, la paire d'oligonucléotides consistant en :

- un premier oligonucléotide d'une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 1 : 5'-CTCTTACCGGTTTGTTC-3', ou sa séquence complémentaire et

- un second oligonucléotide d'une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 2 : 5'-GCCTGGACACCTTTCGAC-3', ou sa séquence complémentaire.

2. Paire d'oligonucléotides, selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le premier oligonucléotide comprend additionnellement une séquence promotrice qui peut être reconnue par une enzyme ARN polymérase ADN dépendante.

3. Paire d'oligonucléotides, selon la revendication 2, caractérisée par le fait que la séquence promotrice qui peut être reconnue par une enzyme ARN polymérase ADN dépendante est une polymérase T7.

4. Premier oligonucléotide, selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé par le fait qu'il consiste essentiellement en la séquence suivante :

SEQ ID No. 3 :

5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGCTCTTACCGGTTTGTTC-3'.

5. Oligonucléotide destiné à être utilisé comme sonde de détection d'une séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya, la sonde de détection étant d'une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 nucléotides consécutifs issus de :

SEQ ID No. 4 : 5'-CTCTCAGGCACCATCTGGC-3', ou sa séquence complémentaire, ladite séquence comportant au moins un moyen de marquage.

6. Oligonucléotide, selon la revendication 5, destiné à permettre une détection en temps réelle, caractérisé par le fait que l'oligonucléotide est encadré de deux bras, l'un en position 5' et l'autre en position 3' dudit oligonucléotide, chaque bras ayant une longueur comprise entre 5 et 15 nucléotides, préférentiellement comprise entre 6 et 10 nucléotides et ces bras étant complémentaires l'un de l'autre afin de présenter l'oligonucléotide sous forme d'une boucle en l'absence de la séquence cible localisée dans le gène E1 du génome du virus du Chikungunya.

7. Oligonucléotide, selon la revendication 6, dont l'extrémité libre d'un des bras comporte un marqueur fluorescent et l'extrémité libre de l'autre bras comporte un absorbeur de fluorescence.

8. Oligonucléotide, selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, caractérisée par le fait qu'il consiste essentiellement en la séquence suivante :

SEQ ID No. 5 : 5'-[6-FAM]-CGAGCGACTCTCAGGCACCATCTGGCTCGCTCG-[DabSyl]-3', ou sa séquence complémentaire.

9. Oligonucléotide, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 5, caractérisé par le fait que chaque oligonucléotide est d'une longueur comprise entre 12 et 30  
5 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10 ou 12 nucléotides consécutifs, et préférentiellement d'une longueur comprise entre 15 et 26 nucléotides et comprenant au moins un fragment de 10, 12 ou 15 nucléotides.

10 10. Utilisation d'une paire d'oligonucléotides, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 9, dans une réaction d'amplification d'acides nucléiques ou comme sonde de détection, selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, du génome du virus du Chikungunya susceptible d'être  
15 présent dans un échantillon biologique.

11. Méthode de détection d'acides nucléiques du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon, dans laquelle l'échantillon est soumis à une  
20 réaction d'amplification d'acides nucléiques utilisant une paire d'oligonucléotides, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 9, en présence des réactifs d'amplification nécessaires à une telle amplification et la présence d'amplicons d'intérêt est détectée.

25

12. Méthode, selon la revendication 11, caractérisée en ce que la réaction d'amplification utilisée est une RT-PCR.

30 13. Méthode, selon la revendication 11, caractérisée en ce que la réaction d'amplification utilisée est une technique d'amplification transcriptionnelle.

14. Méthode, selon la revendication 13, caractérisée en ce que la réaction d'amplification utilisée est la technique NASBA.

5

15. Méthode d'amplification du gène E1 du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- incuber l'échantillon dans un tampon d'amplification en présence de deux amorces d'amplification, chacune ayant une longueur comprise entre 10 et 50 nucléotides, l'une comprenant additionnellement une séquence promotrice, l'autre de polarité opposée à l'amorce associée à la séquence promotrice, pour s'hybrider respectivement en amont et en aval d'une zone d'intérêt localisée dans le gène E1 du virus du Chikungunya,
- ajouter les réactifs suivants dans l'échantillon:
  - une enzyme ayant une activité RNA dépendant DNA polymérase,
  - une enzyme ayant une activité DNA dépendant DNA polymérase,
  - une enzyme ayant une activité RNase H,
  - une enzyme ayant une activité DNA dépendant RNA polymérase, et
- maintenir le mélange réactionnel ainsi créé sous des conditions appropriées et pendant une durée de temps suffisante pour qu'une amplification ait lieu.

25

20

10

15

30

16. Kit de détection du gène E1 du virus du Chikungunya susceptible d'être présent dans un échantillon, contenant :

- au moins une paire d'oligonucléotides selon les

revendications 1 à 4 ou 9,

- au moins un oligonucléotide marqué ou pouvant être marqué, selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, et ayant une séquence d'acide nucléique substantiellement complémentaire avec au moins une partie de la séquence d'acide nucléique amplifiée,
- des réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification.

10           17. Kit selon la revendication 16, dans lequel les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification sont des réactifs permettant une amplification NASBA.

1/4

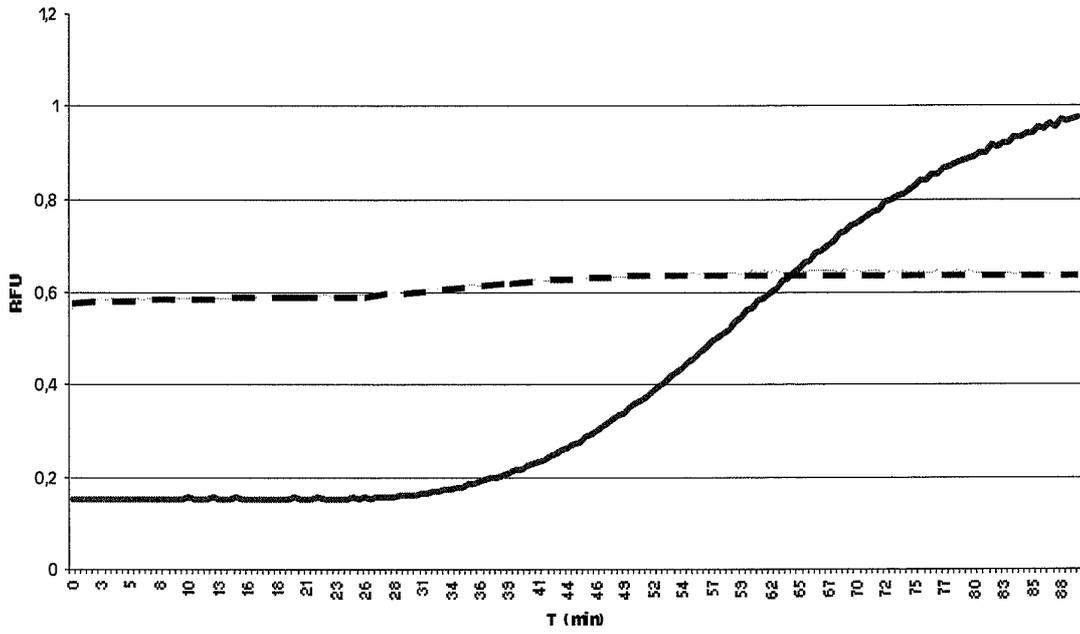


Figure 1

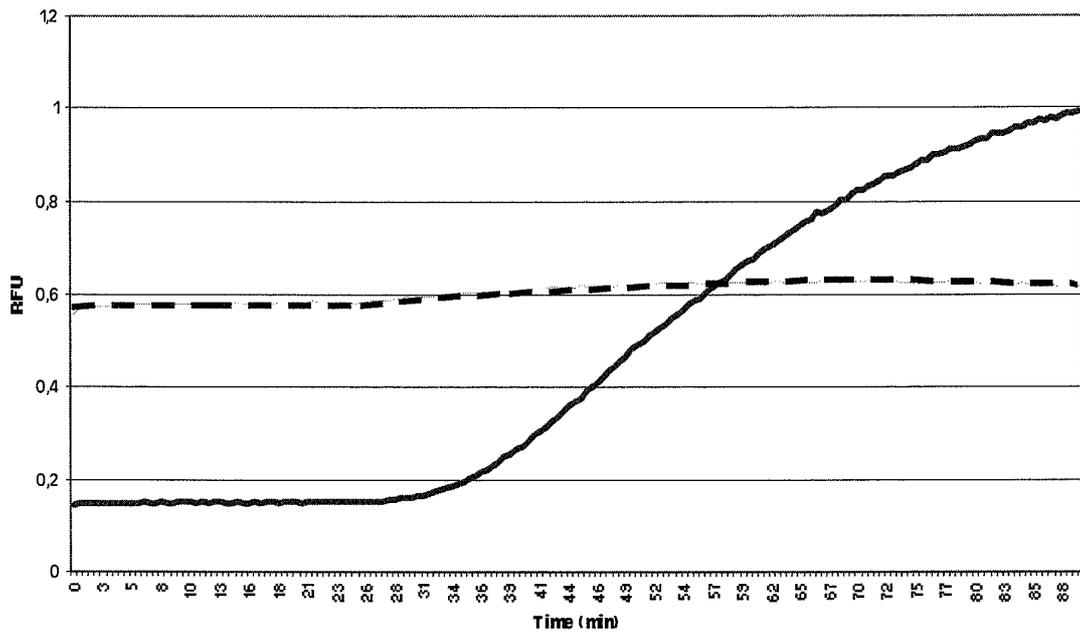


Figure 2

2/4

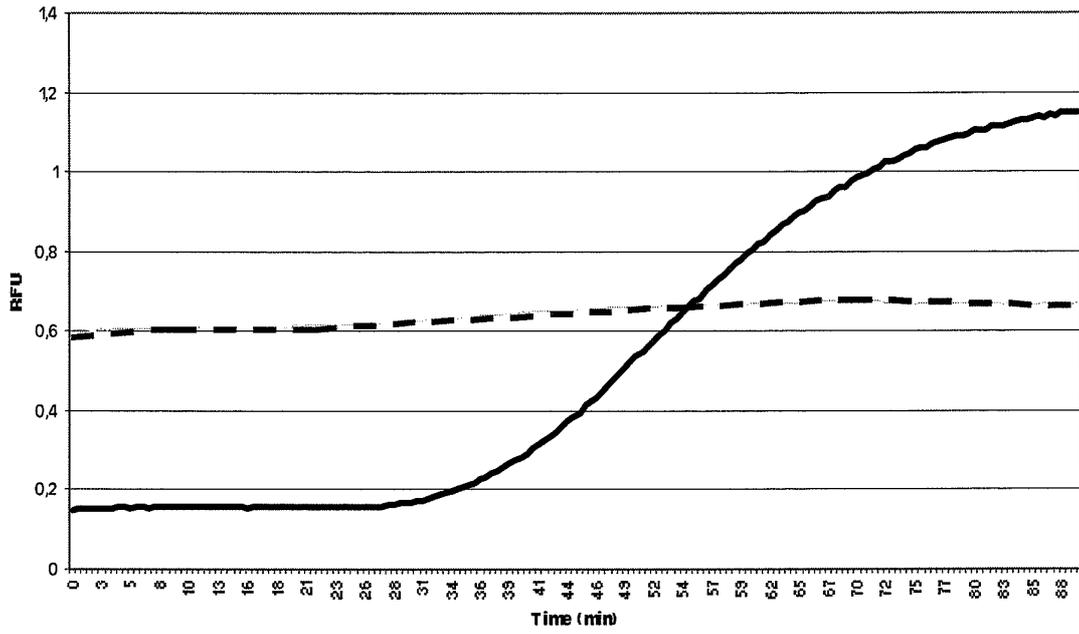


Figure 3

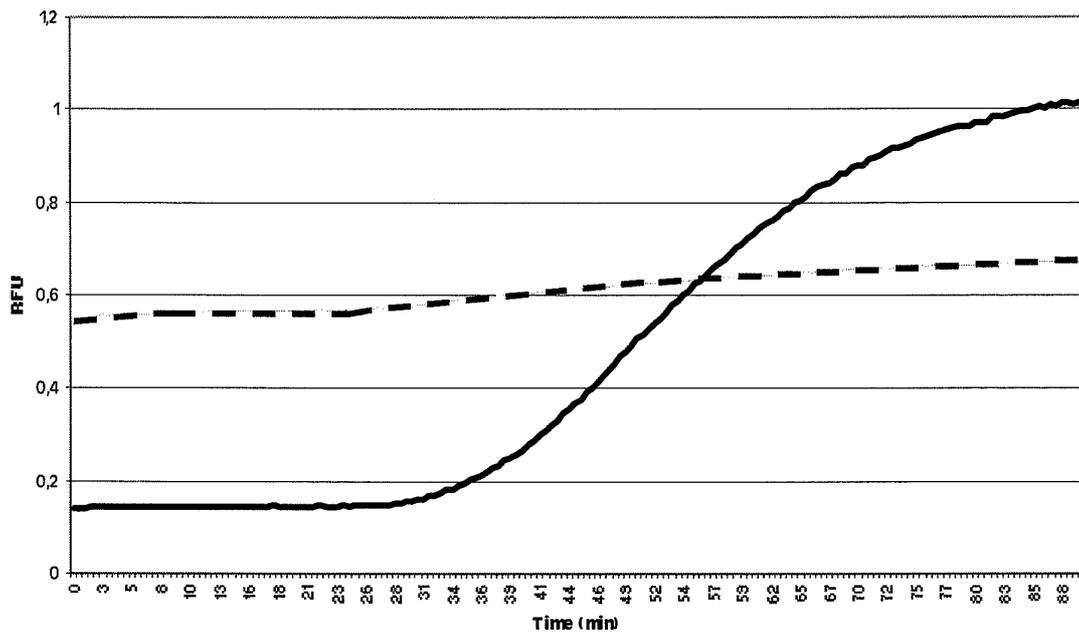


Figure 4

3/4

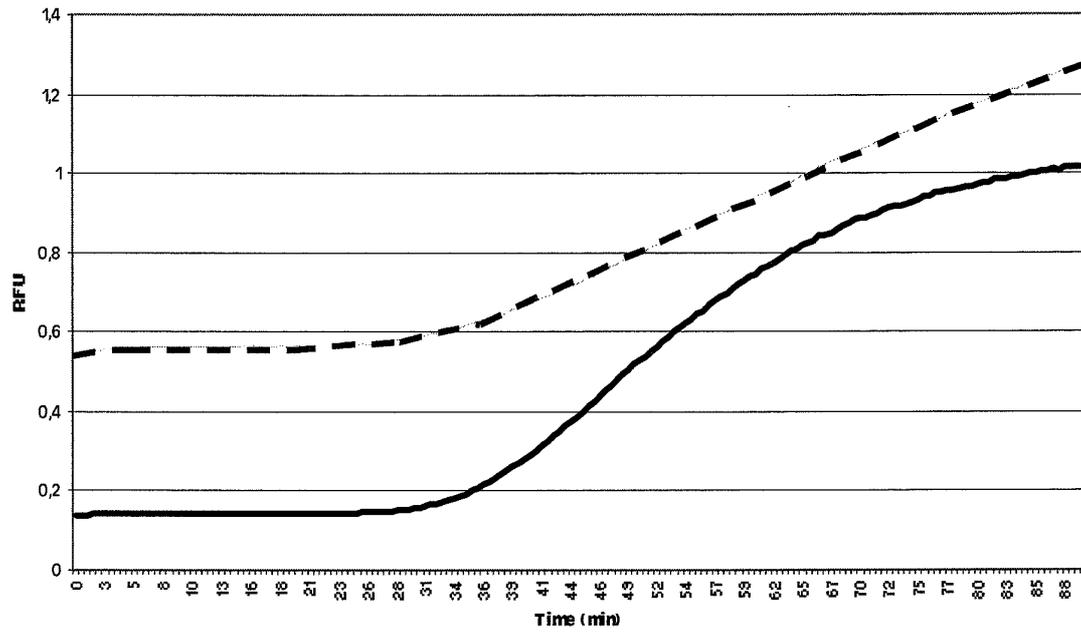


Figure 5

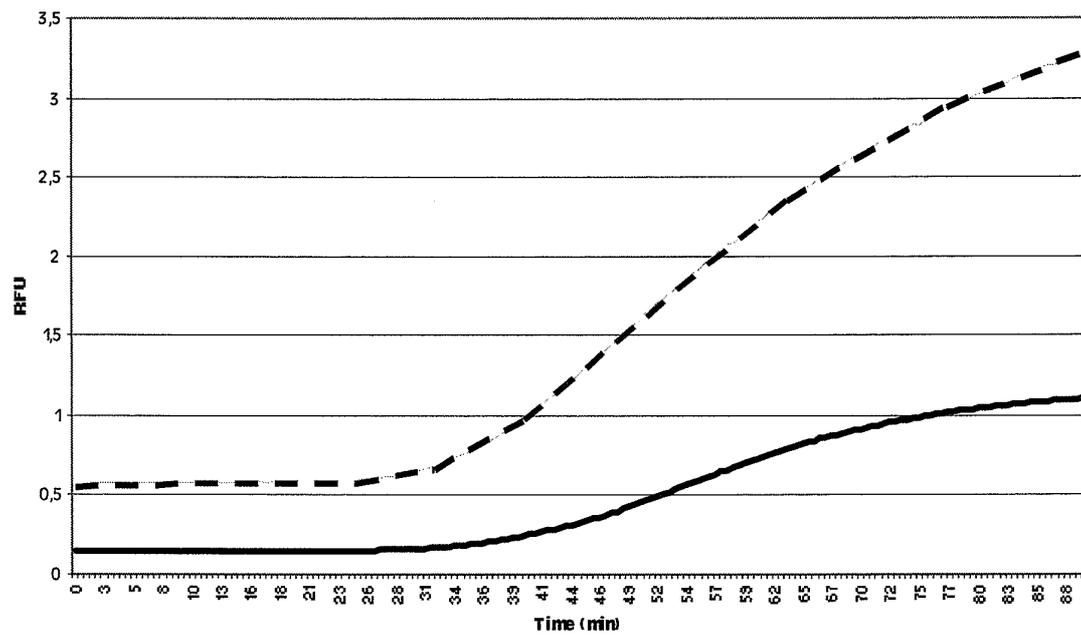


Figure 6

4/4

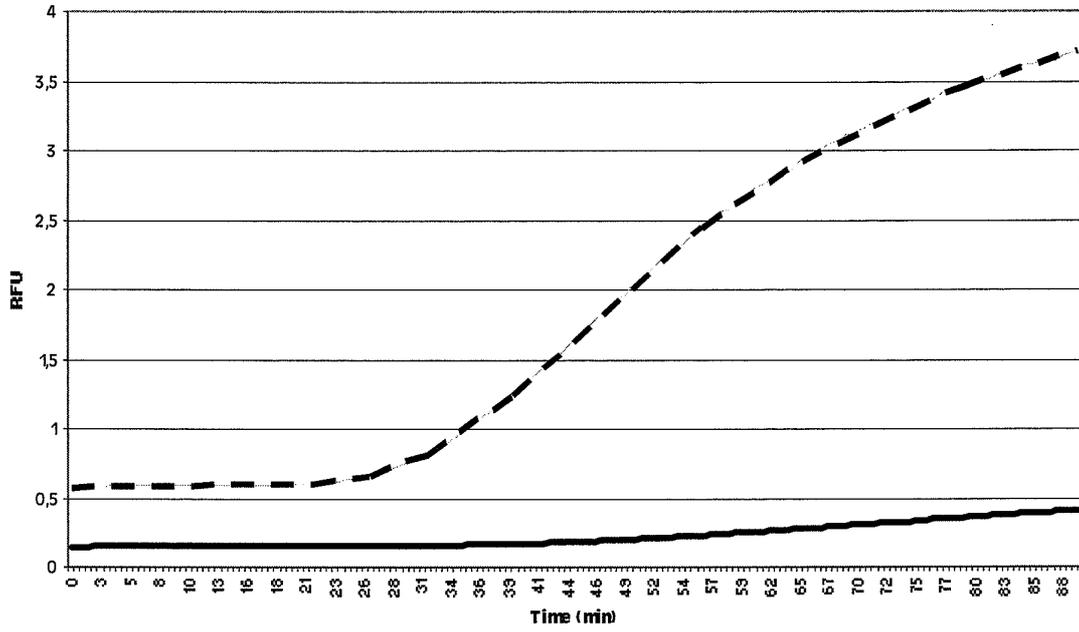


Figure 7

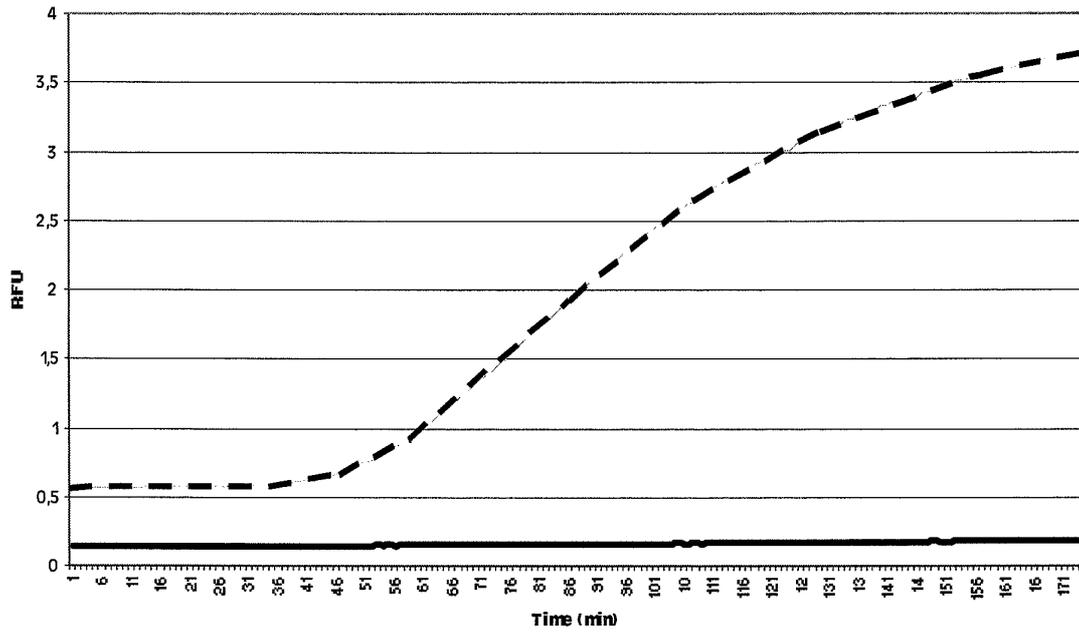


Figure 8

Sequences Patent In. ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux

<120> Oligonucléotides, utilisation, méthode de détection et kit permettant de diagnostiquer la présence du gène E1 du virus du Chikungunya

<130> Chik

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Chikungunya virus

<400> 1  
ctcttaccgg gtttgttgc 19

<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Chikungunya virus

<400> 2  
gcctggacac ctttcgac 18

<210> 3  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Chikungunya virus

<400> 3  
attctaatac gactcactat aggggctctt accgggtttg ttgc 44

<210> 4  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Chikungunya virus

<400> 4  
ctctcaggea ccatctgge 19

<210> 5  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Chikungunya virus

<400> 5  
cgagcgactc tcaggcacca tctggctcgc tgc 33



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 697264  
FR 0757598

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	PASTORINO B ET AL: "Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 124, no. 1-2, mars 2005 (2005-03), pages 65-71, XP004714877 ISSN: 0166-0934 * le document en entier * * tableau 1 *	1-17	C07H21/00 C12N15/40 C12Q1/68
Y	SMITS H L ET AL: "APPLICATION OF THE NASBA NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD FOR THE DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E6-E7 TRANSCRIPTS" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 54, no. 1, 1995, pages 75-81, XP009015131 ISSN: 0166-0934 * le document en entier * * page 78 *	15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	EDWARDS ET AL: "Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus" JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 39, no. 4, 19 juillet 2007 (2007-07-19), pages 271-275, XP022164805 ISSN: 1386-6532 * le document en entier * * tableau 1 *	1-17	C12Q
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 février 2008		Pinta, Violaine	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 697264  
FR 0757598

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
Y	SANTHOSH ET AL: "Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus" JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 39, no. 3, 15 juin 2007 (2007-06-15), pages 188-193, XP022118546 ISSN: 1386-6532 * le document en entier * * figure 1 *	1-17	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	HASEBE F ET AL: "Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction" JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 67, no. 3, juillet 2002 (2002-07), pages 370-374, XP002470888 ISSN: 0146-6615 * le document en entier * * figure 1; tableau 1 *	1-17	
A	KHAN AFJAL HOSSAIN ET AL: "Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 83, no. Pt 12, décembre 2002 (2002-12), pages 3075-3084, XP002458289 ISSN: 0022-1317 * le document en entier *	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 février 2008		Pinta, Violaine	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 697264  
FR 0757598

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	DATABASE GENBANK 14 janvier 2003 (2003-01-14), KHAN A.H ET AL: "Chikungunya virus strain S27 prototype, complete genome" XP002458292 accession no. AF369024 * abrégé *		
X	----- WO 2005/026388 A (CENIX BIOSCIENCE GMBH [DE]; ECHEVERRI CHRISTOPHE [DE]; HYMAN ANTHONY []) 24 mars 2005 (2005-03-24) * page 45, ligne 11 *	4	
E	----- WO 2007/105111 A (PASTEUR INSTITUT [FR]; DESPRES PHILIPPE [FR]; BREHIN ANNE-CLAIRE [FR];) 20 septembre 2007 (2007-09-20) * le document en entier * * page 46 *	1-3	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		28 février 2008	Pinta, Violaine
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0757598 FA 697264**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28-02-2008

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005026388 A	24-03-2005	AU 2004272738 A1	24-03-2005
		CA 2538495 A1	24-03-2005
		EP 1682574 A2	26-07-2006
		JP 2007505826 T	15-03-2007
-----			
WO 2007105111 A	20-09-2007	CA 2545597 A1	15-09-2007
-----			