

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 octobre 2013 (10.10.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/150122 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07H 21/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/057150

(22) Date de dépôt international :
4 avril 2013 (04.04.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1253122 4 avril 2012 (04.04.2012) FR

(71) Déposants : ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG
[FR/—]; 20 Avenue du Stade de France, F-93218 La
Plaine Saint Denis Cedex (FR). CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
[FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16
(FR). UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1 [FR/—]; 5
Boulevard Henri IV, CS 19044, F-34967 Montpellier (FR).
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 [FR/—];
43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeur-
banne (FR).

(72) Inventeurs : FOURNIER-WIRTH, Chantal; Etablis-
sement Français du Sang, 20 Avenue du Stade de France, F-
93218 La Plaine Saint Denis Cedex (FR). LEREAU, My-
riam; Etablissement Français du Sang, 20 Avenue du Stade
de France, F-93218 La Plaine Saint Denis Cedex (FR).
CANTALOUBE, Jean-François; Etablissement Français
du Sang, 20 Avenue du Stade de France, F-93218 La
Plaine Saint Denis Cedex (FR). VASSEUR, Jean-
Jacques; 5 Allée du Plein Sud, F-34980 Combaillaux
(FR). MORVAN, François; 17 rue de l'opale, F-34170
Castelnau Le Lez (FR). MEYER, Albert; 11 Rue des Ras-
casses, F-34470 Perols (FR). MAYEN, Julie; 343 rue Jo-
liot Curie, F-84270 Vedene (FR). CHAIX, Carole; 5 Che-
min de Tholomé, F-69970 Chaponnay (FR). FARRE, Ca-
role; 139 Avenue du Maréchal de Saxe, F-69003 Lyon
(FR).

(74) Mandataire : HIRSCH & ASSOCIES (GROUPEMENT
161); 58, Avenue Marceau, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES COMPRISING THIOL FUNCTIONS AND THE USE OF SAME FOR THE DE-
TECTION OF NUCLEIC ACIDS

(54) Titre : OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES COMPENANT DES FONCTIONS THIOL ET LEUR UTILISATION POUR LA
DETECTION D'ACIDES NUCLEIQUES

(57) Abstract : The present invention concerns a modified oligonucleotide having two or a plurality of thiol functions, capable of
being immobilised on a gold surface or on a grafted surface, in particular a surface comprising at least one carbon-carbon double
bond or one carbon-carbon triple bond or halogen acetamide functions, preferably maleimide or acrylamide functions. The invention
also concerns a method for detecting a nucleic acid in a biological sample comprising a step of detecting hybridisation between a
modified oligonucleotide and an amplified target nucleic acid from the biological sample. The invention more specifically concerns a
method for detecting genotyping or sequencing of a pathogenic organism, preferably a virus.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un oligonucléotide modifié possédant deux ou plusieurs fonctions thiol, apte à être im-
mobilisé sur une surface d'or ou sur une surface greffée, notamment une surface comportant au moins une double liaison carbonecar-
bone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acryla-
mide. L'invention concerne également une méthode de détection d'un acide nucléique dans un échantillon biologique comprenant
une étape de détection d'hybridation entre un oligonucléotide modifié et un acide nucléique cible amplifié à partir de l'échantillon
biologique. L'invention concerne plus particulièrement une méthode de détection de génotypage ou de séquençage d'un organisme
pathogène, de préférence un virus.

WO 2013/150122 A1



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES COMPRENANT DES FONCTIONS
THIOL ET LEUR UTILISATION POUR LA DETECTION D'ACIDES
NUCLEIQUES

5 **DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention concerne un oligonucléotide modifié possédant deux ou plusieurs fonctions thiol, apte à être immobilisé sur une surface d'or ou sur une surface greffée, notamment une surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de
10 préférence des fonctions maléimide ou acrylamide. L'invention concerne également une méthode de détection d'un acide nucléique dans un échantillon biologique comprenant une étape de détection d'hybridation entre un oligonucléotide modifié et un acide nucléique cible amplifié à partir de l'échantillon biologique. L'invention concerne plus particulièrement une méthode de détection, de génotypage ou de
15 séquençage d'un organisme pathogène, de préférence un virus.

ETAT DE LA TECHNIQUE

En raison de leur stabilité physicochimique et de la spécificité conférée par
20 l'agencement successif des différents nucléotides qui les composent, les acides nucléiques constituent des molécules extrêmement bien adaptées pour une utilisation dans les procédés de détection et d'identification spécifiques d'organismes humains, animaux, végétaux, bactériens ou viraux.

25 Ces propriétés ont conduit au développement de biocapteurs (en anglais « biosensors ») fiables et sensibles, qui se composent classiquement d'un élément de reconnaissance moléculaire et d'un transducteur. L'élément de reconnaissance moléculaire, appelé « sonde », est généralement immobilisé à la surface du transducteur et présente une spécificité et une sensibilité élevées pour une molécule
30 d'acide nucléique « cible ». Le transducteur a pour rôle de convertir l'évènement de reconnaissance moléculaire, c'est-à-dire l'hybridation entre les séquences nucléotidiques de la sonde et de la cible, en un signal facilement mesurable. Les biocapteurs exploitent ainsi les capacités d'appariement de deux séquences nucléotidiques complémentaires contenues dans la sonde et la cible, et engendrent un
35 signal lorsque l'hybridation des deux séquences se produit.

Les biocapteurs se caractérisent par le mode de transduction utilisé pour révéler l'hybridation des séquences sonde et cible.

Les biocapteurs à transduction directe permettent de détecter l'hybridation des séquences sans recourir à un marquage particulier. Ils comprennent par exemple les systèmes électrochimiques, dans lesquels la transduction s'effectue par des réactions de transfert d'électrons, tels que l'ampérométrie, basée sur la détection de changements de courant pour un potentiel constant, la conductimétrie, reposant sur la détection de changements de conductivité entre deux électrodes, ou la potentiométrie, basée sur la détection de changements de potentiel, pour un courant constant. Les biocapteurs à transduction directe comprennent également les systèmes gravimétriques, basés sur des technologies piézoélectriques, et utilisant par exemple les propriétés d'un cristal de quartz, dont la fréquence change en réponse à des modifications qui interviennent à sa surface. Généralement rapides et spécifiques, les biocapteurs à transduction directe présentent néanmoins une sensibilité limitée (10^{-9} à 10^{-12} M). Les biocapteurs à transduction directe sont bien adaptés pour la réalisation de systèmes de diagnostic peu onéreux, à usage unique et portables.

Les biocapteurs à transduction indirecte nécessitent, quant à eux, le marquage des séquences d'acides nucléiques cibles, et requièrent la mise en œuvre d'étapes de lavage avant détection. Les biocapteurs à transduction indirecte se présentent généralement sous la forme de systèmes optiques, dans lesquels la détection est effectuée dans un lecteur couplé à un microscope confocal, sur la base d'une émission lumineuse par un ou plusieurs marqueurs fluorescents en réponse à une excitation induite par un laser. Les biocapteurs à transduction indirecte requièrent donc généralement de lourds instruments, compliqués à manipuler et nécessitant des personnes qualifiées, mais ils présentent une sensibilité de détection élevée (10^{-12} à 10^{-15} M). Les biocapteurs à transduction indirecte constituent la technologie la plus employée dans le domaine du diagnostic à base d'acides nucléiques.

Les biocapteurs, à transduction directe ou indirecte, permettent de détecter des milliers ou dizaines de milliers d'hybridations de séquences d'acides nucléiques simultanément et sont généralement agencés sous la forme d'un arrangement ordonné de sondes immobilisées sous forme de points sur un support solide. Chaque point contient environ 10^6 sondes identiques possédant la même séquence nucléotidique, et la séquence nucléotidique des sondes diffère d'un point à un autre.

35

Les « microréseaux » (en anglais « microarrays ») sont des biocapteurs de haute complexité, comprenant 1000 à 10^6 points d'une taille d'environ 20 à 50 μm .

Ils sont très sophistiqués et onéreux et sont principalement destinés au séquençage de l'ADN, à l'étude des maladies génétiques et aux analyses de polymorphisme. Ce type de biocapteur est notamment développé par les compagnies Affymetrix, Illumina et Agilent. Les « macroréseaux » (en anglais « macroarrays ») sont, pour leur part, des biocapteurs de faible complexité comprenant 1000 à 10000 points d'une taille supérieure ou égale à 200 µm.

L'immobilisation des sondes sur les biocapteurs peut être effectuée par couplage covalent ou de manière non covalente. Le couplage covalent de la sonde avec le transducteur peut être obtenu par exemple par photolithographie ou par réaction d'un oligonucléotide aminé avec une surface revêtue de silane fonctionnalisé. La sonde peut également être immobilisée sur une surface métallique, et notamment sur une surface d'or, par exemple par l'intermédiaire d'une liaison entre un atome d'or et un atome de soufre. Cependant, la liaison Au-S est modérément forte, et une seule liaison or-soufre ne suffit pas à immobiliser une sonde sur la surface d'or de façon très stable. En effet, les procédés de détection comprennent des étapes, notamment de lavage, qui occasionnent de fortes contraintes mécaniques susceptibles de déstabiliser la liaison Au-S.

La sonde peut également être couplée avec le transducteur de manière non-covalente, par exemple par adsorption électrostatique. Le couplage non covalent peut par exemple résulter de l'interaction entre les phosphates chargés négativement de l'ADN de la sonde et la surface du transducteur revêtue de γ -amino propylsilane ou d'une couche de poly-L-lysine. Les interactions non covalentes entre la sonde et le transducteur résistent mal aux étapes de lavage mises en œuvre au cours des procédures de détection, en particulier lorsque la détection est effectuée par transduction indirecte puisque la détection de l'hybridation nécessite, après l'étape d'hybridation elle-même, d'éliminer les séquences de nucléotides cibles marquées ne s'étant pas liées à la séquence nucléotidique de la sonde. Le couplage non covalent ne permet en outre pas de modifier significativement les conditions opératoires pour augmenter la stringence des étapes d'hybridation ou de lavage et les rendre ainsi plus spécifiques.

Le document EP 0 523 978 divulgue des composés phosphoramidite ou phosphonate utilisables pour la production d'oligonucléotides modifiés par des thiols. Ces composés ne peuvent toutefois être introduits qu'une seule fois et uniquement sur l'extrémité 5' d'un oligonucléotide.

Le document US 7,601,848 divulgue un composé polyfonctionnel comprenant deux atomes de soufre destiné à être incorporé dans des oligomères afin de créer au moins deux liaisons or-soufre et ainsi stabiliser l'oligonucléotide sur la surface d'or.

5 Certains de ces composés comportent une fonction phosphoramidite. Les composés utilisés dans ce document sont néanmoins fabriqués à partir de composés très coûteux et le couplage du composé polyfonctionnel sur les oligonucléotides n'a pas un rendement satisfaisant en raison de l'encombrement stérique de ce composé. Dans ce document, un agent de liaison est nécessaire afin de lier les composés thiol entre eux et

10 ainsi effectuer une multiple introduction de composés thiol dans un oligonucléotide.

Le but de l'invention est par conséquent de développer une sonde formée par un oligonucléotide possédant au moins deux fonctions thiol, susceptible d'être greffée de manière simple et efficace sur des supports variés comprenant aussi bien les surfaces

15 revêtues de métal (par exemple l'or) que les surfaces greffées comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide. La sonde de l'invention pallie au moins partiellement les inconvénients précités et permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité de détection de séquences

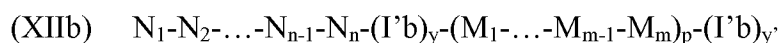
20 nucléotidiques cibles, indépendamment du type de transduction (directe ou indirecte) mis en œuvre lors de la détection.

L'invention vise également à fournir une méthode de détection, de séquençage et/ou de génotypage d'acides nucléiques d'organismes pathogènes ou infectieux ou de

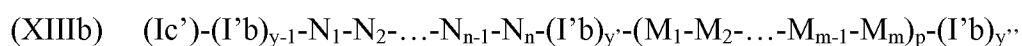
25 gènes responsables ou impliqués dans des maladies, qui soit économique, rapide, sensible, plus flexible et plus facile à automatiser que les méthodes actuelles.

RESUME DE L'INVENTION

30 Un premier objet de l'invention concerne un oligonucléotide modifié répondant à la formule (XIIb):



35 ou à la formule (XIIIb):

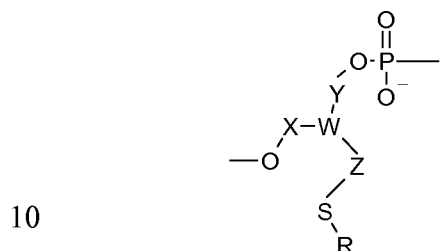


dans lesquelles,

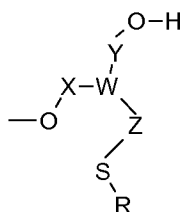
N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

(I'b) représente un composé de formule :



(Ic') représente un composé de formule :



15 n est un nombre entier allant de 4 à 100,

m est un nombre entier allant de 4 à 100,

y est un nombre entier allant de 2 à 12,

p représente 0 ou 1,

y' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et y' est égal à 0 si p vaut 0,

20 y'' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et si p vaut 0 alors y'' vaut 0,

la somme des nombres entiers $(y + y')$ ou $(y + y' + y'')$ étant comprise entre 2 et 12,

X est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,

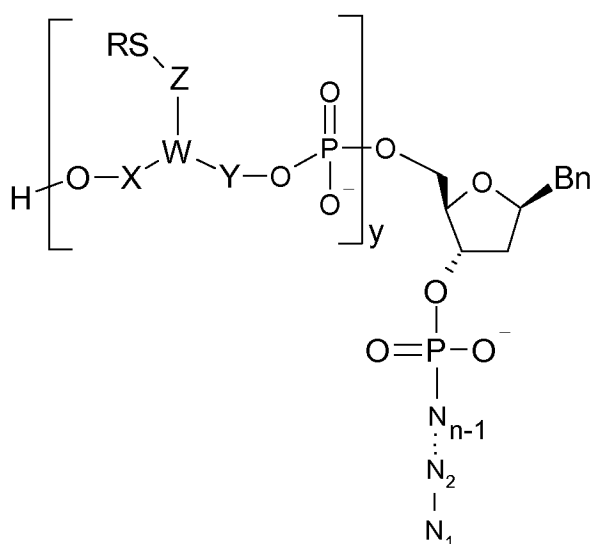
25 Y est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,

Z est choisi parmi les groupements alkoxy en C1-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12, NCO-alkyles en C1-C12, CON-alkyles en C1-C12,

30 W est choisi parmi les groupements alcanes tri-yles en C1-C12, les groupements aryales tri-yles en C6-C18 et les groupements aralcanes tri-yles en C6-C18, de préférence un groupement choisi parmi CH, CCH₃, CCH₂CH₃, un cyclohexane tri-yle et benzène tri-yle,

R est H ou est choisi parmi les groupements acyles en C1-C12, S-alkyles en C1-C12, S-aryles en C6-C12, S-2-pyridine, S-hétéroalkyles oxygénés ou azotés en C1-C12, S-cycloalkyles en C3-C12, S-cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12, et
 5 R1 est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle ou $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$, dans lequel R'_1 , R'_2 et R'_3 sont identiques ou différents et représentent un groupement choisi parmi les alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 12 atomes de carbone et les aryles en C6-C12.

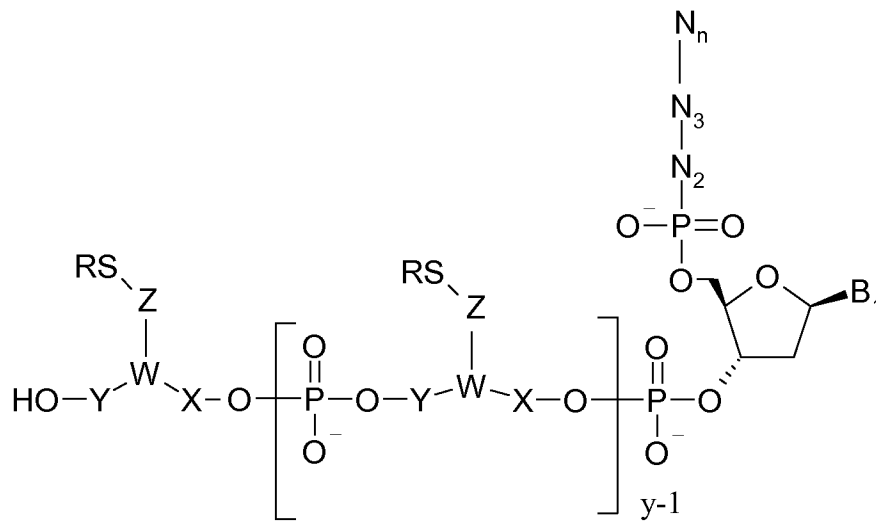
Selon un mode de réalisation de l'invention l'oligonucléotide modifié de l'invention
 10 répond à la formule :



dans laquelle n , y , N_1, \dots, N_{n-1} , X , Y , Z , W et R ont la même définition que ci-dessus, et B_n représente la base du n -ième nucléotide.

15

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide modifié répond à la formule :



dans laquelle $n, y, N_2, \dots, N_n, X, Y, Z, W$ et R ont la même définition que ci-dessus, et B_1 représente la base du 1er nucléotide.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus, comprend une séquence de nucléotides ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) et, éventuellement, une séquence de nucléotides ($M_1-M_2-...-M_{m-1}-M_m$) qui sont spécifiques d'un virus, d'une bactérie ou d'un gène responsable ou impliqué dans une maladie.

10

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides (N_1 - N_2 -...- N_{n-1} - N_n) et, éventuellement, la séquence de nucléotides (M_1 - M_2 -...- M_{m-1} - M_m) sont choisies parmi :

15 - les séquences de SEQ ID NO : 1, de SEQ ID NO : 4, de SEQ ID NO : 27, de SEQ ID NO : 28, de SEQ ID NO : 35 ou de SEQ ID NO : 36 spécifiques du virus de l'hépatite C (VHC),

- les séquences de SEQ ID NO : 16, de SEQ ID NO : 17 ou de SEQ ID NO : 40, spécifiques des flavivirus,

20 - la séquence de SEQ ID NO : 18 ou de SEQ ID NO : 41, spécifique du virus de la Dengue, ou

- la séquence de SEQ ID NO : 19, spécifique du West Nile virus (WNV).

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides (N_1 - N_2 -...- N_{n-1} - N_n) et, éventuellement, la séquence de nucléotides (M_1 - M_2 -...- M_{m-1} - M_m) ont une structure de type anomère alpha, anomère bêta, linéaire, ou tige-boucle (« snail »).

Un autre objet de l'invention concerne un substrat greffé par au moins un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus, ledit substrat comportant au moins une zone de réception revêtue d'une substance tolérant le greffage dudit oligonucléotide modifié.

5

Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite zone de réception dudit substrat greffé est revêtue d'un film d'or ou de platine, et ledit substrat est en métal, de préférence en cuivre, ou ladite zone de réception comporte à sa surface au moins une double liaison carbone-carbone (fonction alcényle) ou une triple liaison carbone-carbone (fonction alcynyle) ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide, et ledit substrat est en plastique, de préférence en polystyrène. Selon un mode de réalisation de l'invention, les substrats utilisés sont des polymères non conducteurs. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les substrats utilisés pour mettre en œuvre l'invention sont conducteurs.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, le substrat greffé plan (en partie ou dans sa totalité) ou courbe, et peut avantageusement prendre une forme sphérique. Selon un mode de réalisation, le substrat est non planaire, par exemple sous forme de microparticules ou nanoparticules, et est de préférence magnétiques.

15 Un autre objet de l'invention concerne une méthode de détection d'au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique, comprenant une étape de détection dudit acide nucléique cible avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode de détection de l'invention comprend les étapes :

- 25 - d'obtention d'au moins un acide nucléique source à partir d'un échantillon biologique,
- de production d'un amplicon par amplification dudit acide nucléique cible à partir de l'acide nucléique source, et
- 30 - de détection de l'hybridation dudit amplicon avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode de détection de l'invention permet de déterminer le génotype et/ou le sous-type d'un virus présent dans un échantillon biologique, et comprend :

35

- la génération d'un amplicon par amplification d'une séquence nucléotidique cible, correspondant à une région génomique du virus portant des informations relatives au génotype et/ou au sous-type viral, et
- la détection de l'hybridation dudit amplicon avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus avec une sonde spécifique d'un génotype et/ou d'un sous-type viral.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'étape de production de l'amplicon de la méthode de détection de l'invention est réalisée avec un mélange d'amorces nucléotidiques, de préférence choisies parmi les couples d'amorces :

- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9, lorsque l'amplicon est généré à partir du VHC, quelque soit le génotype viral impliqué. Ce couple d'amorces est générique et permet d'amplifier un amplicon « long » de 401 nt à partir de tout génotype de VHC ;
- SEQ ID NO : 10 et SEQ ID NO : 9, couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 191 nt spécifiques du génotype 1a/1b ;
- SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 9, couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 108 nt spécifiques du génotype 2 ;
- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 11, couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 143 nt spécifiques du génotype 3a ;
- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 30, couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 175 nt spécifiques du génotype 4a/4d ; et
- SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21, et/ou SEQ ID NO : 22 et SEQ ID NO : 21 lorsque l'amplicon est généré à partir d'un flavivirus.

Un autre objet de l'invention concerne un kit de détection d'au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique, comprenant :

- au moins un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus et au moins un substrat comportant au moins une zone de réception revêtue d'une substance tolérant le greffage dudit oligonucléotide modifié, ladite zone de réception étant de préférence revêtue d'or, de platine ou comporte au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide
- au moins un substrat greffé tel que décrit ci-dessus.

Un autre objet de l'invention concerne un oligonucléotide possédant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID

NO : 27, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 35, SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO : 40 et SEQ ID NO : 41.

5 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un oligonucléotide ou d'un oligonucléotide modifié tels que décrits ci-dessus ou d'un substrat greffé tel que décrit ci-dessus pour détecter au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite utilisation permet le diagnostic ou le génotypage de souches virales, de préférence du VHC, des virus de la Dengue ou du West Nile.

Les avantages de la présente invention sont les suivants :

- 15 - l'oligonucléotide modifié de l'invention portant les fonctions thiol est peu coûteux à produire,
- l'oligonucléotide modifié de l'invention peut être immobilisé de manière stable sur une surface d'or, ou sur une surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide,
- 20 - l'utilisation de l'oligonucléotide modifié de l'invention dans des méthodes de détection, de séquençage et/ou de génotypage d'acides nucléiques permet de détecter spécifiquement des séquences nucléotidiques cibles de plusieurs centaines de nucléotides,
- 25 - la séquence nucléotidique de l'oligonucléotide modifié de l'invention est avantageusement plus courte que celles des sondes utilisées dans les méthodes de détection et/ou de génotypage connues, tout en présentant une meilleure sensibilité et spécificité de détection.

30 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui suit d'un mode de réalisation préféré de l'invention, donnée à titre d'exemple et en référence aux dessins annexés.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

35

La figure 1 représente un schéma décrivant un procédé de synthèse des composés (I).

Les figures 2A et 2B représentent respectivement un schéma décrivant un procédé de synthèse d'un oligomère des composés de l'invention à partir de composés (Ia) et à partir de composés (Ib).

La figure 3 représente un schéma décrivant un procédé de synthèse d'un composé (XIIC) oligonucléotidique greffé par un oligomère de (I) à son extrémité 5'.

La figure 4 représente un schéma exposant un procédé de synthèse d'un composé (XIIIC) oligonucléotidique greffé par un oligomère de (I) à son extrémité 3'.

La figure 5 représente un histogramme du taux de greffage d'oligonucléotides modifiés sur une surface d'or.

La figure 6 représente un schéma exposant la stabilité du greffage d'oligonucléotides modifiés sur une surface d'or en fonction du temps à 60°C.

La figure 7 représente un schéma exposant la stabilité du greffage d'oligonucléotides modifiés sur une surface d'or en fonction du temps à 80°C.

Les figures 8 et 9 représentent des diagrammes schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde tétrathiol de type 3a.

La figure 10 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde tétrathiol de type 1a/1b.

La figure 11 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec des sondes de type 1a/1b portant 1, 2, 4, 6 ou 8 groupements thiol.

La figure 12 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection de fluorescence, réalisés avec une sonde de type 1a/1b monothiol à différentes densités de greffage.

La figure 13 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection de fluorescence, réalisés avec une sonde de type 1a/1b dithiol à différentes densités de greffage.

La figure 14 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection de fluorescence, réalisés avec une sonde de type 1a/1b tétrathiol à différentes densités de greffage.

La figure 15 représente les résultats d'un test d'hybridation sonde/cible avec une sonde tétrathiol greffée sur surface d'or.

La figure 16a représente les réactions entre l'oligonucléotide modifié selon l'invention et la surface greffée par des groupements alcényles ou alcynyles activés.

La figure 16b représente les réactions entre l'oligonucléotide modifié selon l'invention et la surface greffée par des groupements alcényles ou alcynyles avec activation lumineuse ($\lambda = 265$ nm).

La figure 17 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde VHC tétrathiol de type 1a/1b.

La figure 18 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec un mélange de deux sondes VHC tétrathiol de types 2a/2c et /2b.

La figure 19 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde VHC tétrathiol de type 3a.

La figure 20 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde VHC tétrathiol de type 4a/4d.

La figure 21 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde tétrathiol générique pour les flavivirus.

La figure 22 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde tétrathiol spécifique du sérotype 4 de la Dengue.

La figure 23 représente un diagramme schématisant les résultats de tests ELOSA avec détection par fluorescence, réalisés avec une sonde tétrathiol générique pour le virus West Nile.

EXPOSE DES MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

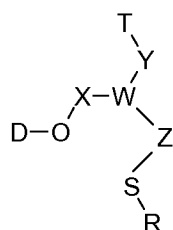
La présente demande décrit la préparation de composés de structure phosphoramidite, H-phosphonate ou de composés reliés à un support solide présentant une fonction thiol protégée. Ces composés thiol sont destinés à être introduits dans des oligonucléotides pour former les oligonucléotides modifiés selon l'invention. Les oligonucléotides modifiés ainsi obtenus peuvent présenter plusieurs fonctions thiol.

La présente invention concerne donc les oligonucléotides modifiés susceptibles d'être obtenus par le procédé décrit ci-après et comprenant de 2 à 12 fonctions thiol.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de tels oligonucléotides modifiés pour détecter au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique.

Composé thiol

Les composés thiol destinés à être introduits dans les oligonucléotides modifiés de la présente invention répondent à la formule (I) suivante :



5

(I)

dans laquelle :

- T est un groupement choisi parmi $-\text{O}-\text{P}(\text{OR}_1)\text{N}(\text{R}_2)_2$, $-\text{O}-\text{PH}(\text{O})\text{O}^-$,
 10 $-\text{OC}(\text{O})\text{JC}(\text{O})\text{NH}-$,
- R_1 est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle, $\text{R}'_1\text{R}'_2\text{R}'_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2$, et R'_1 , R'_2 , R'_3 , identiques ou différents, représentent un groupement choisi parmi les alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 12 atomes de carbone et les aryles en C6-C12,
 - R_2 est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 12 atomes de carbone, pyrrolidine,
 - J est choisi parmi une simple liaison, un groupement $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{OPhOCH}_2-$ où Ph est un benzyle,
 - représente un support solide,
- D est un groupement protecteur des alcools,
- W est choisi parmi les groupements alcanes tri-yle en C1-C12, les groupements aryles tri-yles en C6-C18 et les groupements aralcanes tri-yles en C6-C18,
- Z est choisi parmi les groupements alkoxy en C1-C12, cyclohétéroalkyles oxygéné ou azoté en C3-C12, NCO-alkyles en C1-C12, CON-alkyles en C1-C12,
- 25 Y est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,
- X est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,
- 30 R est choisi parmi les groupements acyles en C1-C12, S-alkyles en C1-C12, S-aryles en C6-C12, S-2-pyridine, S-hétéroalkyles oxygénés ou azotés en C1-C12, S-cycloalkyles en C3-C12, S-cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12.

35

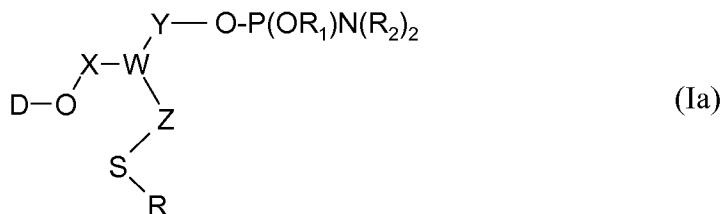
Au sens de la présente invention, par « alcane tri-yle », on entend les alcanes tri-yle linéaires, ramifiés ou cycliques, éventuellement substitués par un ou plusieurs

groupement alkyles. Parmi les groupements aryles tri-yles qui peuvent être présents dans le composé selon l'invention, on peut citer le benzène tri-yle et le naphthalène tri-yle. Parmi les groupements aralcanes, on peut citer le 1,3,5-triméthylbenzène tri-yle et le triméthylnaphtalène tri-yle.

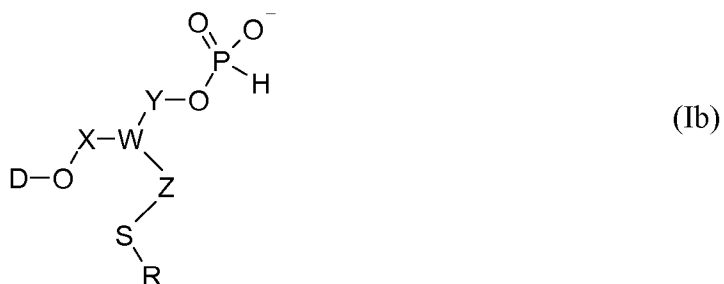
5

Le composé (I) peut être distingué en trois sous-composés (Ia), (Ib) et (Ic) répondant aux formules (Ia), (Ib) et (Ic) ci-dessous dans lesquelles les paramètres X, Y, Z, R, R₁, R₂ et D ont la même définition qu'exposée ci-dessus pour la formule (I) :

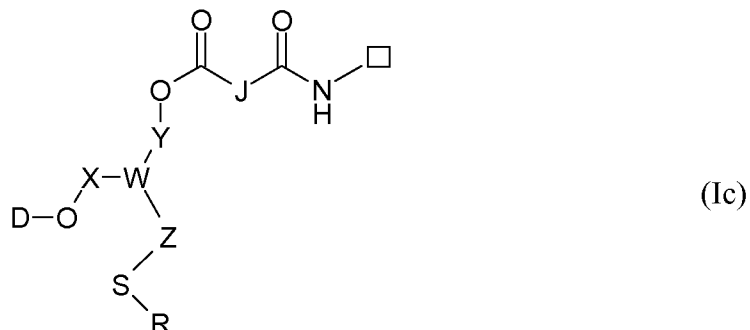
10



15



20



25

De préférence, R₁ est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle et R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, et R'₁, R'₂, R'₃ identiques ou différents représentent un groupement choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 6 atomes de carbone, le phényl ; préférentiellement R₁ est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle et R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, et R'₁, R'₂, R'₃ identiques ou différents représentent un groupement choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 3 atomes de carbone, le phényl ; encore plus préférentiellement R₁ est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle, 2-(triméthylsilyl)éthyle, 2-(triphénylsilyl)éthyle, 2-(diphénylméthylsilyl)éthyle.

30

35

De préférence, R₂ est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 6 atomes de carbone. De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr).

De préférence, le support solide □ est choisi parmi les résines, en particulier
5 parmi les résines à base de polystyrène, polyacrylamide, polyéthylène glycol, cellulose, polyéthylène, polyester, latex, polyamide, polydiméthylacrylamide, les polymères hydrophiles synthétiques ou naturels, les billes de verre, les gels de silice.

De préférence, W est choisi parmi les groupements alcanes tri-yle en C1-C6, un
10 groupement aryle tri-yle en C6-C12, un groupement aralcane tri-yle en C6-C12, plus particulièrement parmi les groupements CH, CCH₃, CCH₂CH₃, les cyclohexanes tri-yle et les benzènes tri-yle.

De préférence, D est choisi parmi les groupements protecteurs des alcools qui permettent une déprotection orthogonale par rapport aux autres groupements du composé (I). Plus particulièrement, D est choisi parmi le 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr), le 9-phenylxanthen-9-yl (pixyl) ou le Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc).
15 Le groupement protecteur pixyl est décrit notamment dans le document Chattopadhyaya et Reese, *Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1978, 639-640. Un autre groupement protecteur des alcools peut être un groupement tert-butyl-diméthylsilyl, dans ce cas un support en polystyrène sera particulièrement préféré.

De préférence, Z est choisi parmi les groupements aminoalkyles en C1-C6,
20 alkoxy en C1-C6, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C6, NCO-alkyles en C1-C6, CON-alkyles en C1-C6.

De préférence, Y est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C6, aminoalkyles en C1-C6, alkoxy en C1-C6, cycloalkyles en C3-C6,
25 cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C6.

De préférence, X est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C6, aminoalkyles en C1-C6, alkoxy en C1-C6, cycloalkyles en C3-C6, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C6.

De préférence, R est choisi parmi les groupements acyles en C1-C12, S-alkyles en C1-C6, S-aryles en C6, S-hétéroalkyles oxygénés ou azotés en C6, S-cycloalkyles en C6, S-cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C6.
30

Selon un mode de réalisation, les alkyles linéaires ou ramifiés sont choisis parmi les groupements méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle, heptyle, octyle, nonyle, décyle, undécyle, dodécyle, isopropyle, isobutyle, *tert*-butyle.

Selon un mode de réalisation, les aminoalkyles sont choisis parmi les
35 groupements aminométhyle, aminoéthyle, aminopropyle, aminobutyle, aminopentyle, aminohexyle, aminoheptyle, amino-octyle, aminononyle, aminodécyle,

aminoundécyle, aminododécyle, aminoisopropyle, aminoisobutyle, amino-*tert*-butyle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote.

Selon un mode de réalisation, les alkoxy sont choisis parmi les groupements méthoxy, éthoxy, propyloxy, oxybutyloxy, pentyloxy, hexyloxy, heptyloxy, octyloxy, nonyloxy, déciloxy, undéciloxy, dodéciloxy, isopropyloxy, isobutyloxy, *tert*-butyloxy comprenant un ou plusieurs atomes d'oxygène.

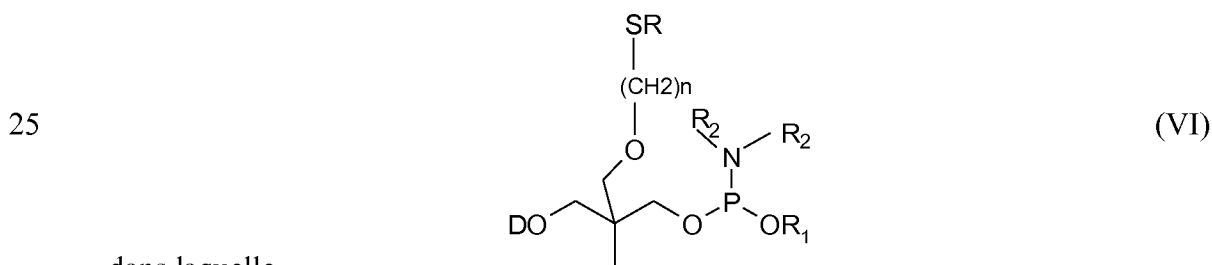
Selon un mode de réalisation, les cycloalkyles sont choisis parmi les cycles, comprenant éventuellement une ou plusieurs insaturations, comprenant entre 3 et 12 atomes de carbone, de préférence 6 atomes de carbone.

Selon un mode de réalisation, les cyclohétéroalkyles sont choisis parmi les cycles substitués par un ou plusieurs atomes d'azote et/ou d'oxygène, comprenant éventuellement une ou plusieurs insaturations et comprenant entre 3 et 12 atomes de carbone, de préférence 5 atomes de carbone et un atome d'azote ou d'oxygène.

Selon un mode de réalisation, les NCO-alkyles et CON-alkyles sont des groupements dans lesquels les alkyles peuvent être des alkyles linéaires ou ramifiés choisis parmi les groupements méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle, heptyle, octyle, nonyle, décyle, undécyle, dodécyle, isopropyle, isobutyle, *tert*-butyle.

Selon un mode de réalisation, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et/ou R₁ est un groupement cyanoéthyle.

Selon un mode de réalisation préféré, le composé thiol (Ia) est le composé (VI) répondant à la formule suivante :



dans laquelle,

n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence compris entre 1 et 6, R, R₁, R₂ et D ont la même définition que ci-dessus pour (Ia).

De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

De préférence, R est un groupement acétyle.

De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

Selon un autre mode de réalisation, le composé thiol (Ia) est le composé (VII) répondant à la formule suivante :



dans laquelle,

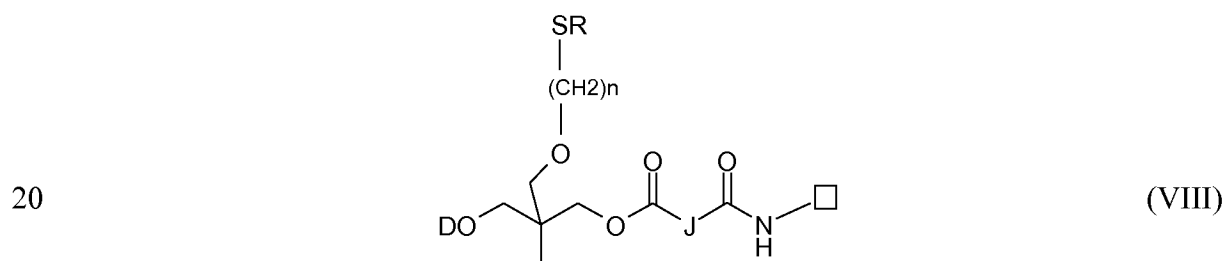
n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence compris entre 1 et 6,
R, R₁, R₂ et D ont la même définition que ci-dessus pour (Ia).

10 De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

De préférence, R est un groupement acétyle.

De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

15 Selon un mode de réalisation, le composé thiol (Ic) est le composé (VIII) répondant à la formule suivante :



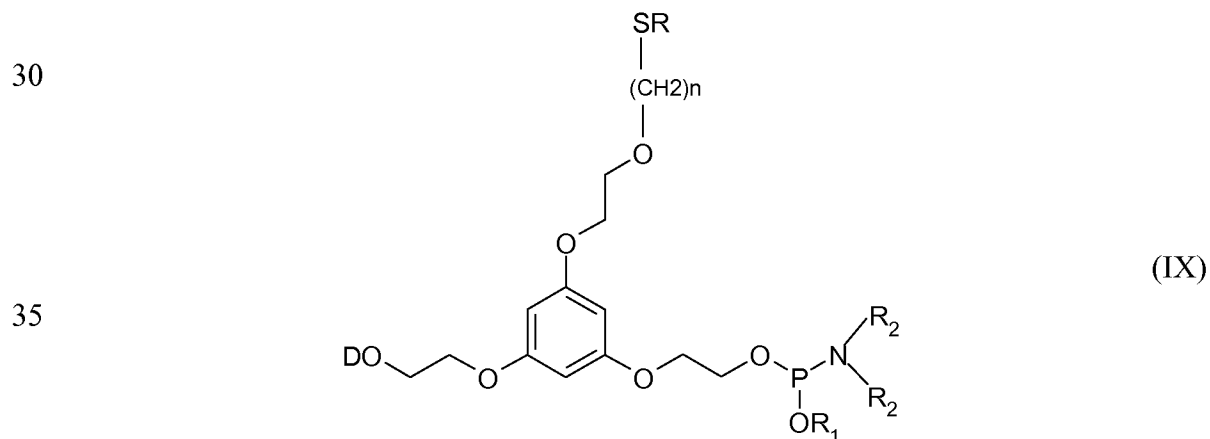
dans laquelle,

n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence entre 1 et 6,

R et □ ont la même définition que ci-dessus pour (Ic).

25 De préférence, R est un groupement acétyle. De préférence, J est un groupement éthyle. De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

Selon un mode de réalisation, le composé thiol (Ia) est le composé (IX) de formule :



dans laquelle,

n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence entre 1 et 6,

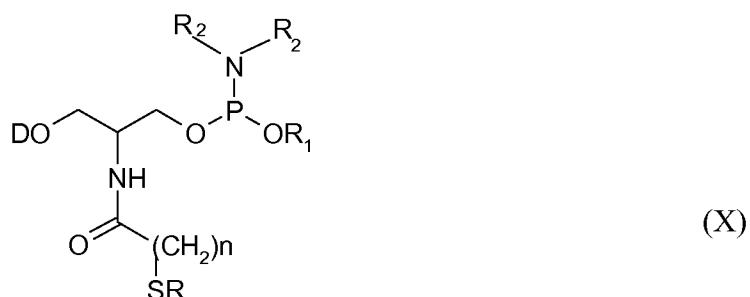
R, R₁, R₂ et D ont la même définition que ci-dessus pour (Ia).

De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

De préférence, R est un groupement acétyle.

De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

Selon un mode de réalisation, le composé thiol (Ia) est le composé (X) de formule :



dans laquelle,

n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence entre 1 et 6,

R, R₁, R₂ et D ont la même définition que ci-dessus pour (Ia).

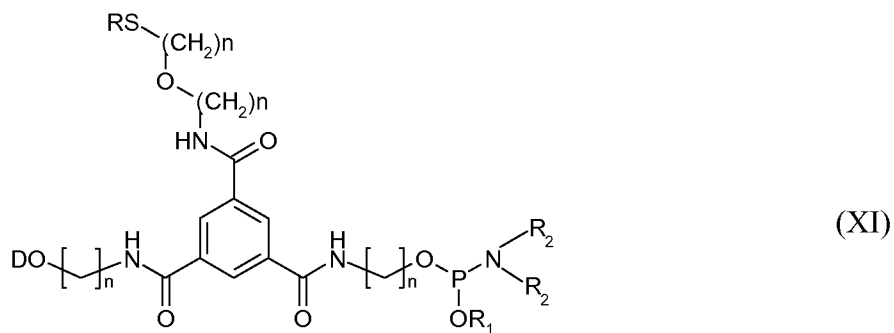
De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

De préférence, R est un groupement acétyle.

De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

Selon un mode de réalisation, le composé thiol (Ia) est le composé (XI) de formule :



dans laquelle,

n est un nombre entier compris entre 1 et 12, de préférence compris entre 1 et 6,

R, R₁, R₂ et D ont la même définition que ci-dessus pour (Ia).

De préférence, R₂ est un groupement isopropyle (iPr) et R₁ est un groupement cyanoéthyle.

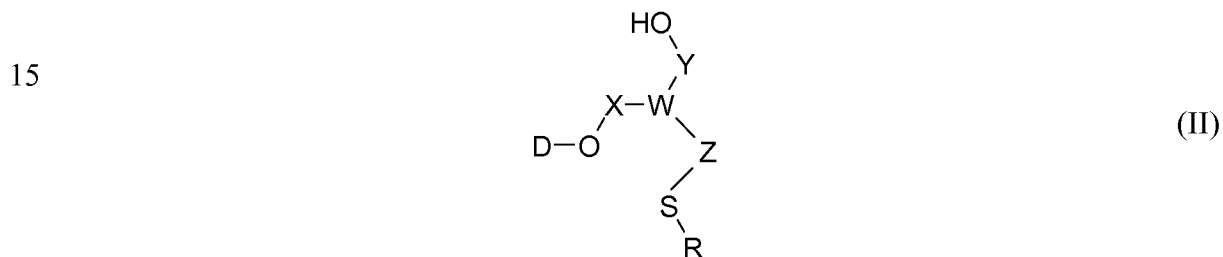
De préférence, R est un groupement acétyle.

5 De préférence, D est le 4,4'-diméthoxytrityle.

Procédé de fabrication

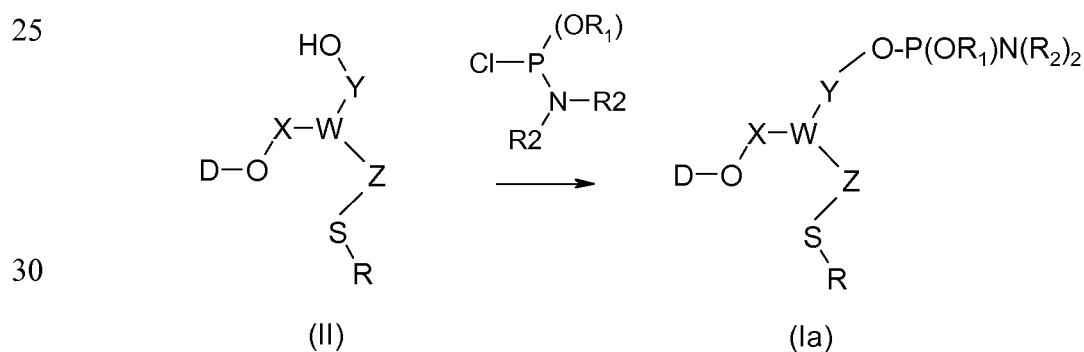
10 Le procédé de fabrication des composés (Ia), (Ib) et (Ic) est représenté sur le schéma de la figure 1.

Les composés (Ia), (Ib) et (Ic) sont obtenus à partir du même composé (II) présentant la formule suivante :

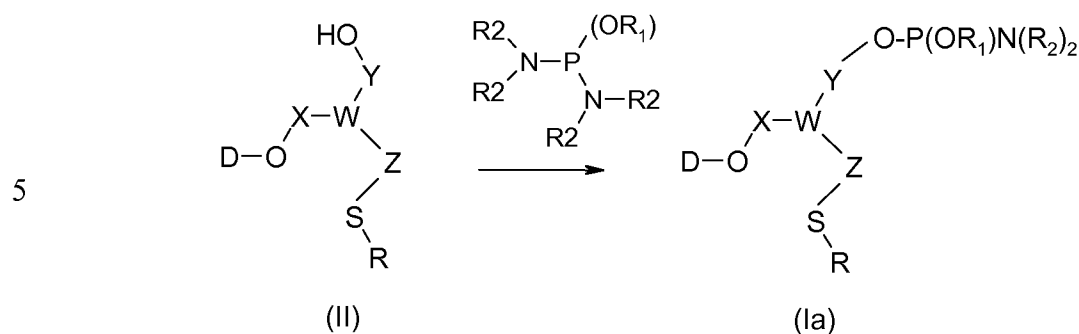


20 dans laquelle, D, X, W, Y, Z et R ont la même définition que dans le composé thiol (I).

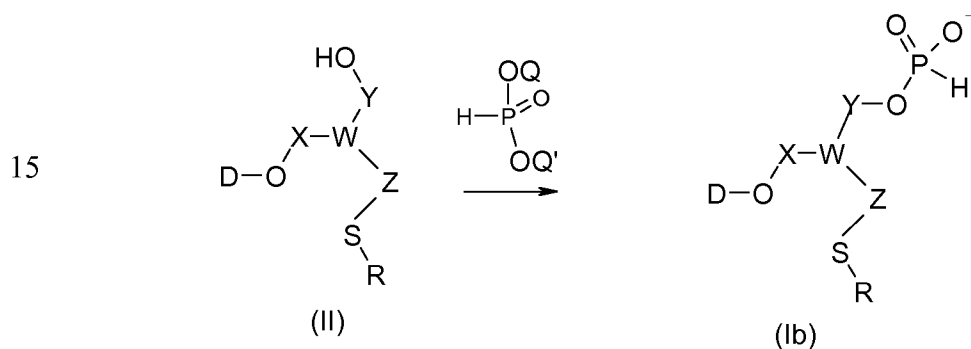
Le composé de formule (Ia) peut être obtenu selon la réaction représentée sur le schéma suivant :



ou selon la réaction représentée sur le schéma suivant, de préférence en présence du sel de diisopropylamine tétrazolure :



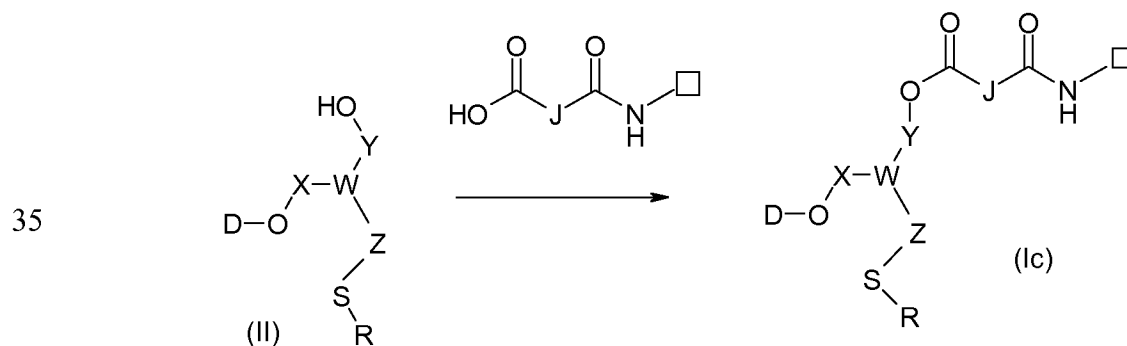
10 Le composé de formule (Ib) peut être obtenu selon la réaction représentée sur le schéma suivant :



20 dans laquelle, Q et Q' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un groupement benzène substitué ou non.

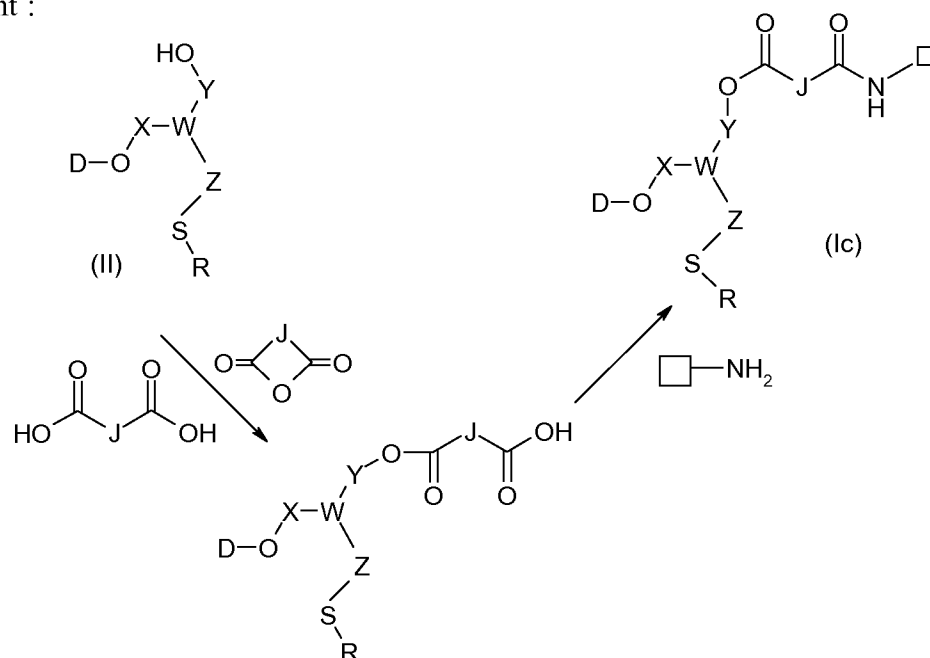
25 La réaction précédente d'obtention du composé (Ia) ou (Ib) s'effectue à partir du composé (II), de préférence en présence d'une base, par exemple la diisopropyléthylamine (DIEA), dans un solvant anhydre, tel que le dichlorométhane anhydre.

30 Le composé de formule (Ic) est également obtenu à partir du composé (II) mais de préférence selon l'étape de réaction représentée sur le schéma suivant :



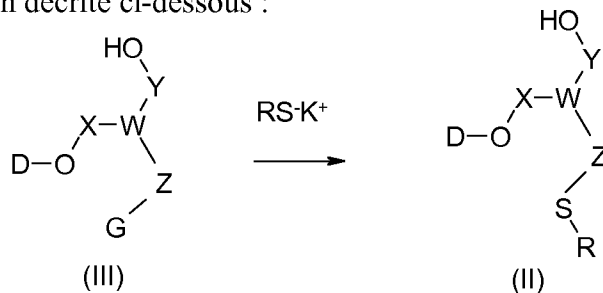
La réaction précédente d'obtention du composé (Ic) s'effectue de préférence dans un solvant anhydre, tel que la pyridine, en présence d'une base, telle que la triéthylamine.

On peut également obtenir le composé (Ic) selon le schéma réactionnel suivant :



Le composé (II) de formule ci-dessus, dans laquelle les groupements X , W , Z , Y et R ont la même définition que dans le composé (I), correspond à un mode de réalisation.

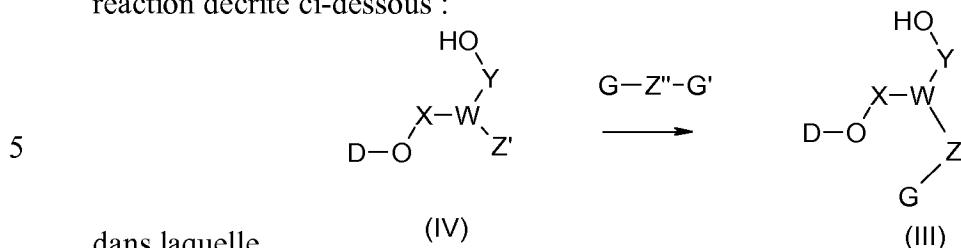
Le composé de formule (II) peut être obtenu à partir du composé (III) selon l'étape de réaction décrite ci-dessous :



dans laquelle G est un halogène, de préférence le brome ou l'iode.

La réaction décrite ci-dessus s'effectue de préférence dans un solvant anhydre, tel que le toluène anhydre et en présence d'un éther couronne.

Le composé (III) peut être obtenu à partir du composé (IV) selon l'étape de réaction décrite ci-dessous :



G et G' sont des atomes d'halogène identiques ou différents, de préférence G et G' sont des atomes de brome ou d'iode,

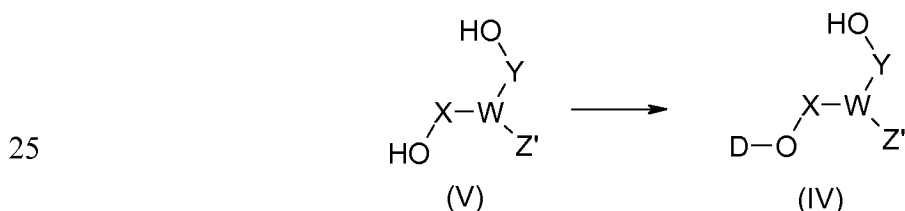
10 Z' est un groupement aminoalkyle en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cyclohétéroalkyle oxygéné ou azoté en C3-C12, NCO-alkyle en C1-C12, CON-alkyle en C1-C12,

Z'' est un groupement alkyle linéaire ou ramifié en C1-C12, aminoalkyle en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyle en C3-C12, cyclohétéroalkyle oxygéné ou azoté en C3-C12, NCO-alkyle en C1-C12, CON-alkyle en C1-C12,

le composé dihalogéné G-Z''-G' étant destiné à réagir avec le groupement Z' du composé (IV) pour conduire à la formation du groupement Z-G du composé (III).

L'étape d'obtention du composé (III) s'effectue de préférence en présence d'un hydrure alcalin, tel que NaH.

20 Le composé (IV) peut être obtenu à partir du composé commercial (V) par protection de la fonction alcool, selon l'étape de réaction suivante :



Cette étape de protection de la fonction alcool est effectuée dans des conditions bien connues de l'homme du métier, en fonction du choix de D.

30 Selon un mode de réalisation, le composé (IV) est obtenu à partir du composé (V) par réaction avec le 4,4'-chlorure de diméthoxytrityle (DMTr-Cl) de préférence dans un solvant, tel que la pyridine afin de protéger la fonction alcool.

Selon un autre mode de réalisation, le composé (IV) est obtenu à partir du composé (V) à partir du chlorure de 9-phénylxantén-9-yle (pixyl-Cl) dans les conditions décrites dans le document Chattopadhyaya et Reese, *Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1978, 639-640.

35

Selon un autre mode de réalisation, le composé (IV) est obtenu à partir du composé (V) par réaction avec le chlorure de fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc-Cl) dans des conditions bien connues de l'homme du métier.

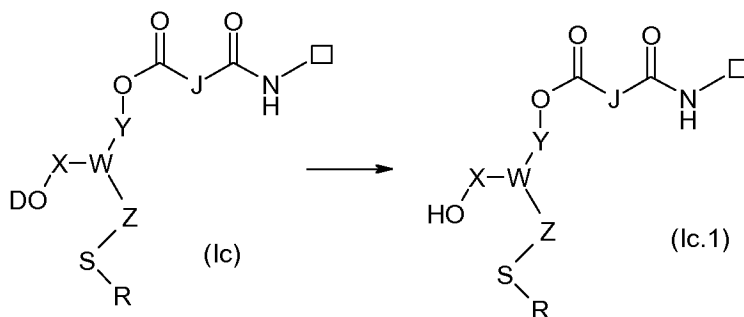
Dans les formules précédentes (II) à (V), X, Y, W, Z, D, R, R₁, R₂ ont les mêmes définitions que dans la définition du composé (I) indiquée ci-dessus.

De préférence, le composé (V) de départ est le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane ou l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl) propionique ou le 1,3,5-tris(hydroxyethoxy)benzène ou le 1,3,5-tris(hydroxyméthyl)cyclohexane ou le 2-amino-1,3-propanediol.

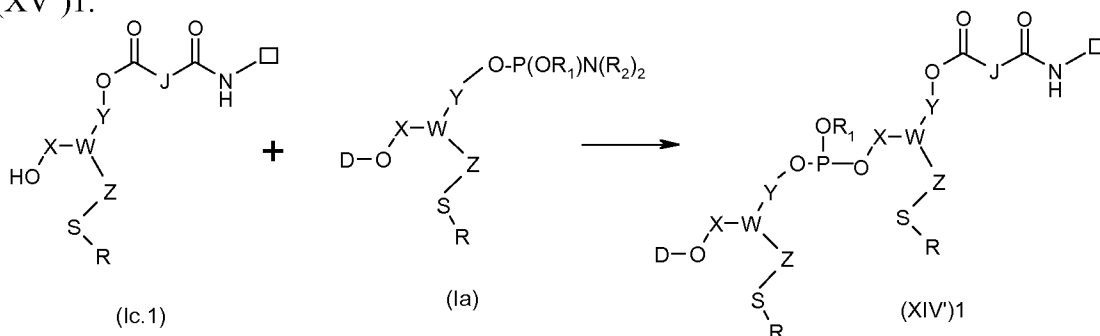
Oligomère du composé thiol

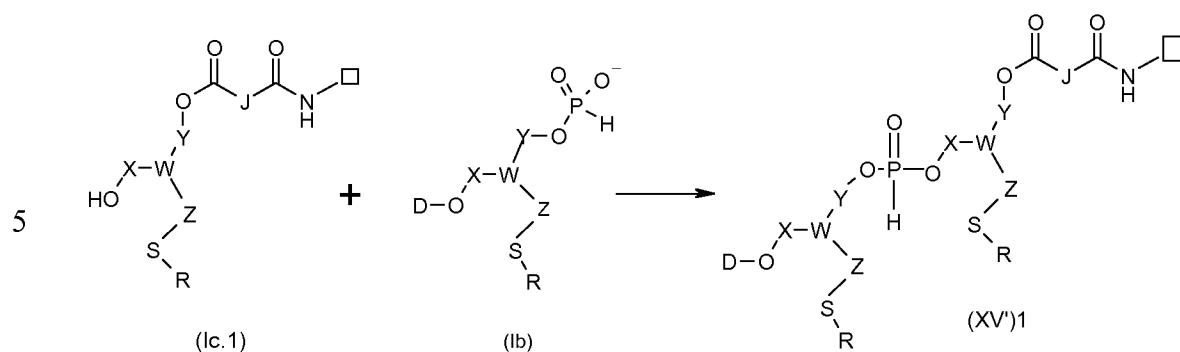
Un oligomère peut être formé à partir de composés thiol de formule (I) précédemment décrits. Le procédé de synthèse de tels oligomères est décrit sur le schéma de la figure 2A pour l'oligomérisation de composés de formule (Ia) et sur le schéma de la figure 2B pour l'oligomérisation de composés de formule (Ib).

Dans une première étape, la fonction alcool du composé (Ic) est déprotégée pour conduire au composé (Ic.1). Cette étape de déprotection s'effectue par des moyens bien connus de l'homme du métier, de préférence en présence de l'acide di ou trichloroacétique pour les groupements DMTr et Pixyl et de pipéridine pour le groupement Fmoc.

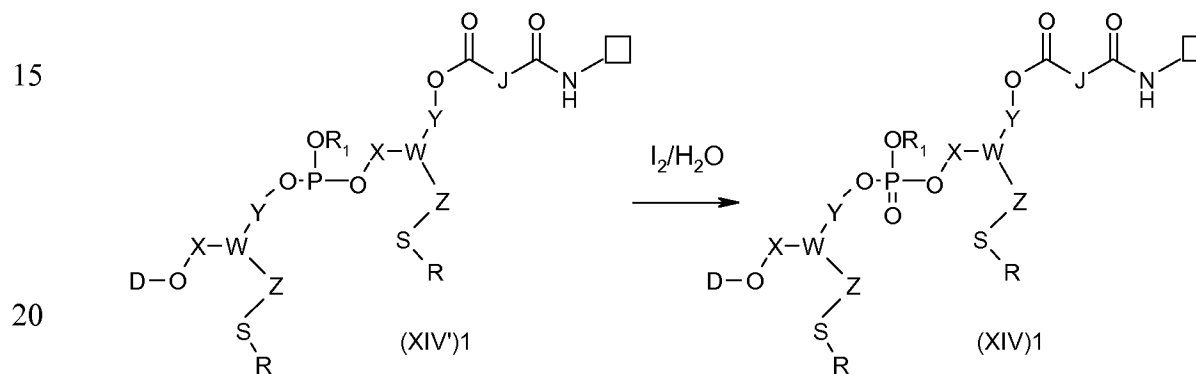


Ensuite, le composé (Ic.1) réagit avec le composé (Ia) ou (Ib) pour conduire respectivement au composé phosphitetriester (XIV')₁ ou H-phosphonate diester (XV')₁.

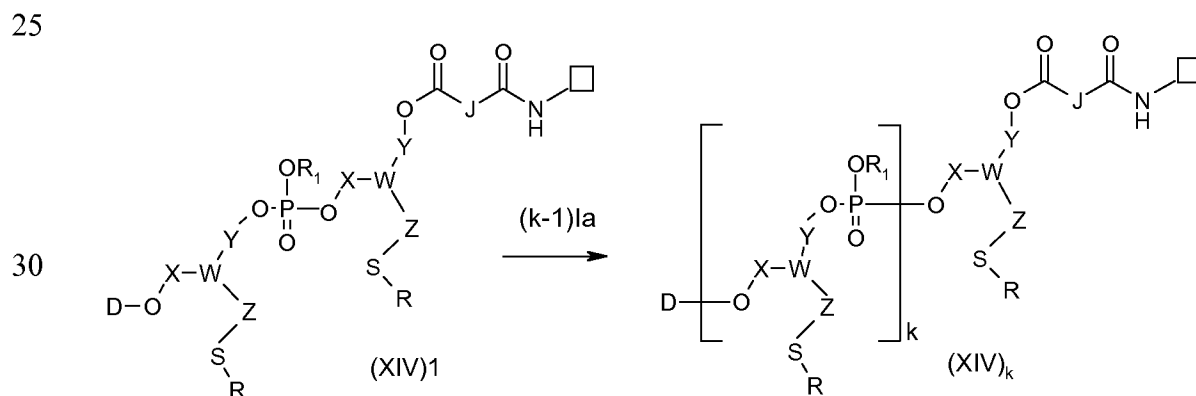




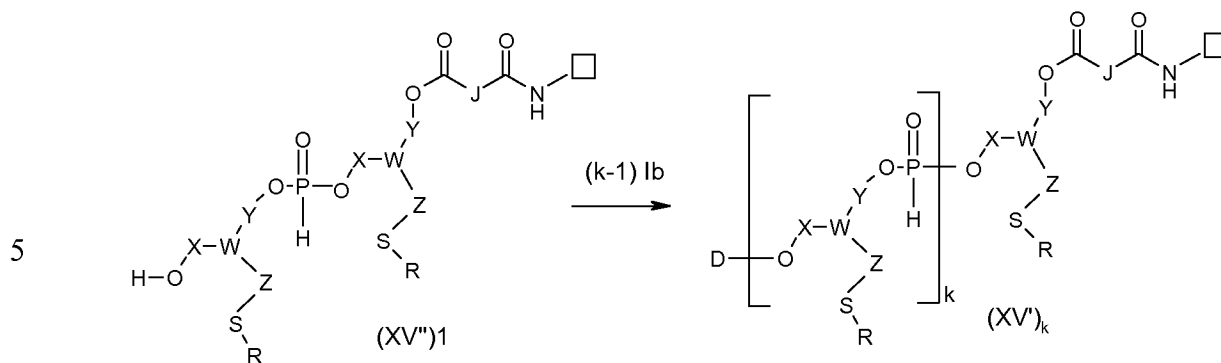
10 Puis, le composé (XIV')1 est oxydé de préférence en présence de diiode, le diiode étant ensuite déplacé par de l'eau apportant l'atome d'oxygène du lien phosphate triester, pour conduire au composé phosphotriester (XIV)1. Cette étape d'oxydation s'effectue après chaque étape de couplage entre un composé (XIV)i et un composé (Ia).



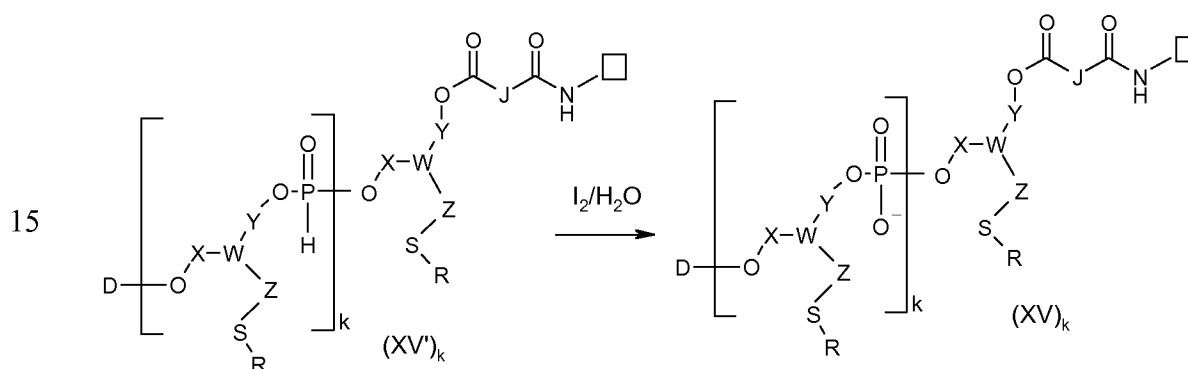
25 Puis, de la même manière, le composé (XIV)1 réagit avec (k-1) composés (Ia) pour conduire, après (k-1) oxydations, au composé (XIV)_k :



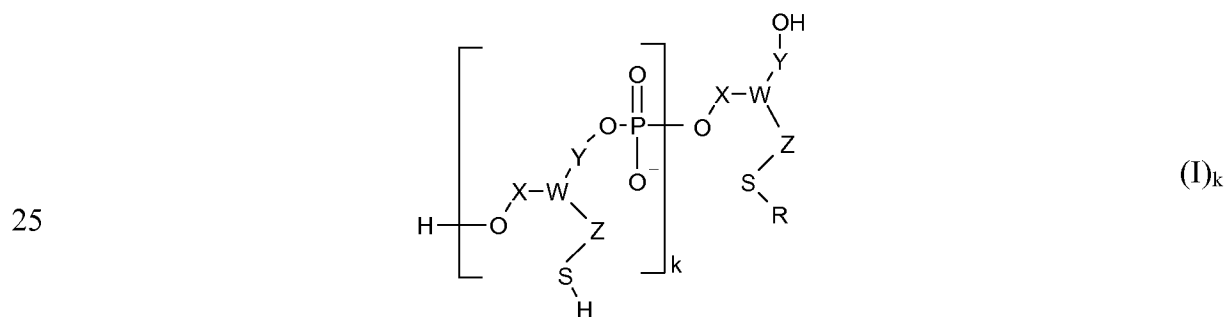
35 et le composé (XV')1 est déprotégé sur sa fonction alcool pour donner (XV'')1 qui réagit avec (k-1) composés (Ib) pour conduire au composé (XV')_k :



10 Puis, le composé (XV')_k est oxydé, de préférence en présence de diiode et d'eau pour conduire au composé phosphodiester (XV)_k.



20 Enfin, une dernière étape éventuelle consiste à déprotéger les composés (XIV)_k ou (XV)_k pour conduire au même composé (I)_k.



30 De préférence, l'oligomère résulte de l'oligomérisation de 2 à 12 composés (I), en particulier entre 2 et 8 composés (I), c'est-à-dire que l'oligomère peut comprendre 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 composés (I). De préférence, l'oligomère thiol destiné à être greffé sur une surface d'or comprend entre 3 et 8, avantageusement entre 4 et 8 composés (I) et l'oligomère thiol destiné à la conjugaison avec une surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide

35 comprend avantageusement entre 2 et 6 composés (I).

Selon un mode de réalisation, l'oligomère est fabriqué uniquement à partir de composés de formule (Ia) ou de composés de formule (Ib). L'oligomérisation

s'effectue par réaction entre la fonction alcool déprotégée d'un premier composé (I) et la fonction phosphoramidite ou H-phosphonate d'un second composé (I).

Il est également possible de prévoir la fabrication d'un oligomère à partir d'un mélange de composés (Ia) et de composés (Ib), ce mode de réalisation présentant moins d'intérêt.

De préférence, l'oligomère est fabriqué en utilisant la chimie des phosphoramidites, c'est-à-dire par oligomérisation de composés de type (Ia).

L'oligomérisation peut être effectuée sur support solide ou en solution. De préférence, l'oligomérisation est effectuée sur support solide. En effet, l'oligomérisation en solution implique des étapes de purifications par chromatographie, étapes non économiquement viables, en particulier pour les petites quantités requises dans les applications en diagnostic.

Le support solide greffé par un oligomère d'un composé (Ia) ou d'un composé (Ib) répond à la formule (XVI)_k ci-dessous :

(Ic) - (I')_k

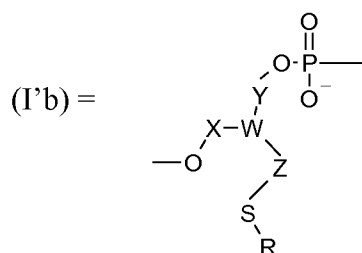
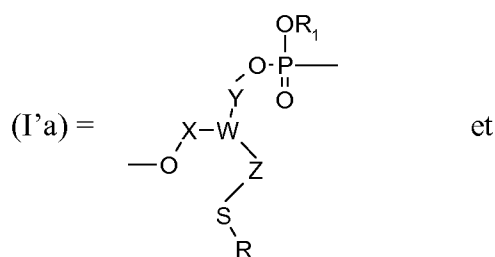
(XVI)_k

dans laquelle :

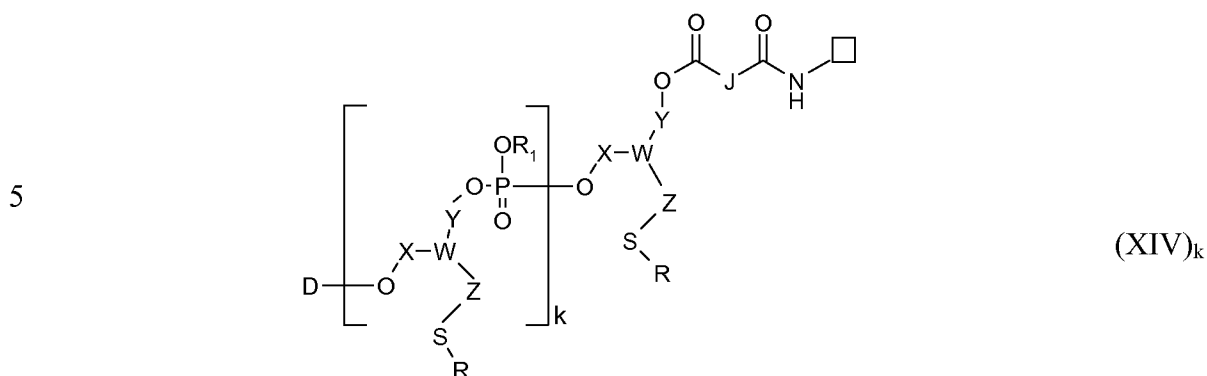
k représente un entier compris entre 1 et 11,

(Ic) a la même signification que ci-dessus,

(I') représente (I'a) ou (I'b), avec :

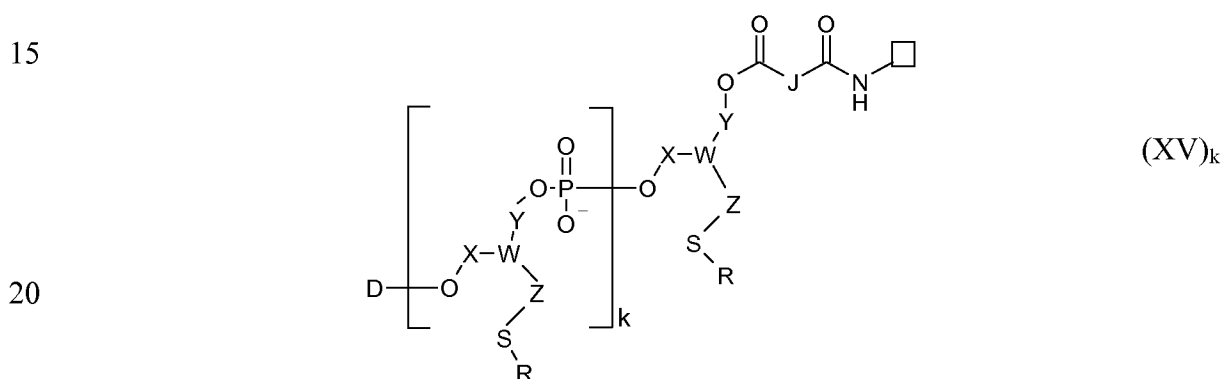


L'oligomère sur support solide formé à partir d'un composé (Ic) et de composés de formule (Ia) répond à la formule (XIV)_k suivante :



10 dans laquelle D, X, Y, W, Z, J, R et R₁ ont la même définition que ci-dessus et R peut en outre représenter H, k est un nombre entier compris entre 1 et 11.

L'oligomère sur support solide formé à partir d'un composé (Ic) et de composés de formule (Ib) répond à la formule (XV)_k suivante :



dans laquelle D, X, Y, W, Z, J et R ont la même définition que ci-dessus et R peut en outre représenter H, k est un nombre entier compris entre 1 et 11.

25 Dans le cas où l'oligomère est formé sur support solide à partir d'un composé (Ic) et de composés (Ib), le composé obtenu (XV)_k répond à la même formule que le composé (XIV)_k mais dans laquelle R₁ est un atome d'hydrogène après oxydation des liens H-phosphonate diesters.

30 A l'issue de la réaction d'oligomérisation, on peut prévoir de déprotéger les fonctions thiol par des méthodes classiques et alors R représente H.

Oligonucléotides modifiés

35 Un objet de la présente invention concerne un oligonucléotide modifié, comprenant au moins dix nucléotides et au moins deux composés thiol (I) tels que précédemment décrits.

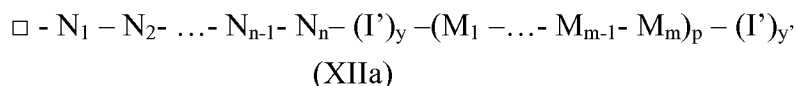
Dans la présente demande, le terme oligonucléotide désigne une chaîne comprenant de 4 à 100 nucléotides.

Le greffage du composé thiol selon l'invention s'effectue en position 3', dans la chaîne, ou en position 5' d'un oligonucléotide.

5 Le procédé de préparation d'un tel oligonucléotide modifié comprend au moins :
- une étape de greffage d'un composé (I) sur un oligonucléotide pour donner un 5'-thiol oligonucléotide, ou

- une étape de greffage d'un nucléotide sur un oligomère d'un composé (I) pour donner un 3'-thiol oligonucléotide.

10 Selon un mode de réalisation, l'oligonucléotide greffé répond à la formule (XIIa) suivante :



dans laquelle,

15 N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,
 M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,
(I') représente un composé de formule (I'a) ou (I'b),
n est un nombre entier allant de 4 à 100,
m est un nombre entier compris allant de 4 à 100,
20 y est un nombre entier allant de 2 à 12,
p représente 0 ou 1,
y' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, y' est égal à 0 si p vaut 0,
la somme des entiers (y + y') n'étant pas supérieure à 12,
□ représente un support solide.

25

L'oligonucléotide modifié (XIIa) présente deux ou plusieurs composés thiol en position 5' d'un oligonucléotide N ou bien dans la chaîne nucléotidique. Il est obtenu par un greffage d'un composé (I) suivi par une élongation de l'oligomère issu de (I) en position 5' d'un oligonucléotide. Puis, dans le cas où p = 1, l'élongation de la chaîne nucléotidique se poursuit. Puis, de la même manière, on peut envisager le greffage d'un ou plusieurs composés (I) supplémentaires en position 5' de l'oligonucléotide M.

30 Un schéma d'obtention du composé (XIIa) est décrit sur la figure 3 sur laquelle les composés thiol sont de type (Ia) et p est égal à 0. Les trois premières étapes de fabrication du composé (XIIa) permettent la synthèse d'un oligonucléotide. La
35 synthèse de l'oligonucléotide est effectuée sur support solide par une méthode classique bien connue de l'homme du métier. Lors de la première étape, un premier nucléotide est greffé sur un support solide, puis les autres nucléotides sont greffés

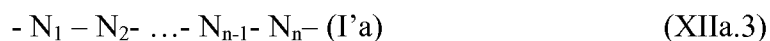
suivant des méthodes de synthèse bien connues de l'homme du métier. Le composé suivant est obtenu :



5 Puis, un autre nucléotide est greffé par une méthode identique pour conduire au composé de formule (XIIa.2).

Lors de l'étape suivante, un composé thiol tel que décrit plus haut, de type (Ia), est greffé en position 5' de l'oligonucléotide (XIIa.2) pour conduire au composé (XIIa.3) :

10

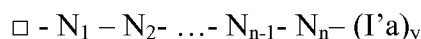


Lors de cette étape, le greffage se fait de manière classique par réaction de la fonction phosphoramidite du composé (Ia) avec la fonction alcool en position 5' du nucléotide terminal du composé (XIIa.2).

15

Sur le schéma de la figure 3, un exemple de synthèse est décrit avec l'oligomérisation du composé thiol de type (Ia) ; un procédé de synthèse similaire est utilisé pour la synthèse d'oligonucléotides modifiés avec des composés thiol de type (Ib).

20 Ensuite, l'oligomérisation telle que décrite précédemment, notamment sur les figures 2A et 2B, se poursuit à partir du composé (XIIa.3) ci-dessus, par réaction avec un ou plusieurs composés (Ia) ou (Ib) pour conduire au composé (XIIa.4) de formule :



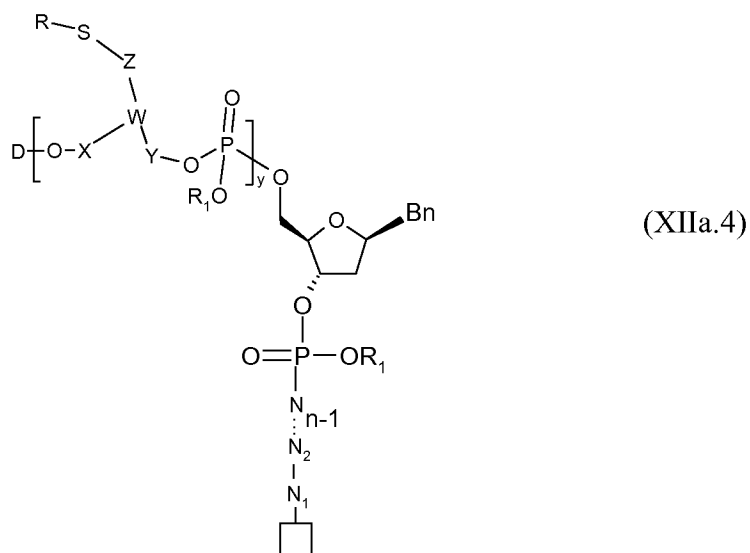
ou en formule développée (dans le cas où $p = 0$) :

25

30

35

dans laquelle,



D, R, X, Y, W, Z, R₁ ont la même définition que pour le composé (I) et R₁ peut en outre représenter H,

n, y et N₁, N₂, ...N_{n-1} ont la même définition que pour le composé (XIIa),

Bn représente une base classiquement utilisée dans une chaîne nucléotidique.

5 Dans le cas où l'élongation de l'oligomère s'effectue avec des composés de type (Ib), l'oligonucléotide modifié présente une structure similaire à celle de l'oligonucléotide modifié (XIIa.4) mais dans laquelle R₁ représente H.

Un greffage ultérieur de composés nucléotides M₁, M₂, ...M_m est ensuite possible pour aboutir au produit (XIIa) avec p = 1. Dans ces cas, l'élongation
10 s'effectue également sur support solide.

Cette étape de greffage s'effectue de manière classique par des méthodes connues de l'homme du métier.

Selon un autre mode de réalisation, l'oligonucléotide greffé répond à la formule (XIIIa) suivante :

15
$$(Ic) - (I')_{y-1} - N_1 - N_2 - \dots - N_{n-1} - N_n - (I')_{y'} - [M_1 - M_2 - \dots - M_{m-1} - M_m]_p - (I')_{y''}$$

(XIIIa)

dans laquelle,

N₁, ...N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,
20 M₁, ... M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,
(I') représente un composé de formule (I'a) ou (I'b),
n est un nombre entier allant de 4 à 100,
m est un nombre entier allant de 4 à 100,
y est un nombre entier allant de 2 à 12,
25 y' est un nombre entier allant de 2 à 12,
p vaut 0 ou 1 si y' est différent de 0 et, si y' vaut 0 alors p vaut 0,
y'' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, si p vaut 0 alors y'' vaut
0,
la somme des entiers (y+y'+y'') n'étant pas supérieure à 12.

30 Un schéma représentant un mode de synthèse du composé (XIIIc) est décrit sur la figure 4 en utilisant un oligomère formé à partir d'un composé de type (Ic) où J est un groupement éthyle, et de composés de type (Ib).

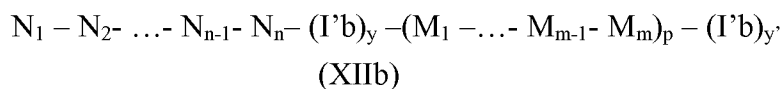
La synthèse du composé de formule (XIIIc) comprend une première étape
35 consistant en l'oligomérisation du composé thiol selon l'invention de formule (I) dont le procédé est décrit précédemment pour conduire au composé de formule (XIIIa.1):

$$(Ic) - (I')_{y-1} \quad (XIIIa.1)$$

Un objet de la présente invention concerne ainsi les composés obtenus à partir des composés de formule (XIIa) et (XIIIa) ci-dessus après coupure de la liaison qui relie l'oligonucléotide modifié au support solide. La coupure de la liaison s'effectue au niveau de la fonction ester.

5

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide modifié non supporté de l'invention présente la structure (XIIb) suivante :



10 dans laquelle,

N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

(I'b) représente un composé de formule telle que définie plus haut,

n est un nombre entier allant de 4 à 100,

15 m est un nombre allant de 4 à 100,

y est un nombre entier allant de 2 à 12,

p représente 0 ou 1,

y' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, y' est égal à 0 si p vaut 0,

la somme des entiers $(y + y')$ n'étant pas supérieure à 12.

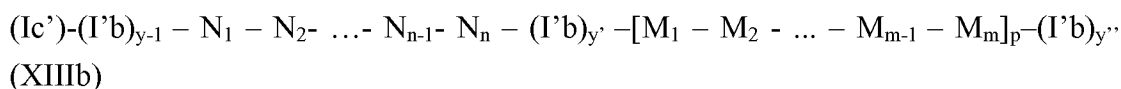
20

Le retrait du support s'effectue en deux étapes avec premièrement une base forte non nucléophile (piperidine ou DBU) pour éliminer les groupements cyanoéthyle si présents (cas des phosphoramidites) et deuxièmement par un procédé classique connu de l'homme du métier, de préférence par un traitement du composé (XIIa) avec de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). Il est nécessaire d'éliminer les groupements cyanoéthyle avant la déprotection des groupements thiol car ils forment de l'acrylonitrile lors de leur élimination qui réagit fortement avec les fonctions thiol.

25

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide modifié non supporté de l'invention présente la structure (XIIIb) suivante :

30



dans laquelle,

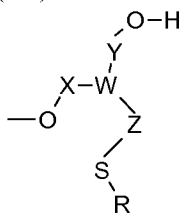
35

N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

(Ic') représente le composé obtenu à partir de (Ic) par coupure de la liaison ester avec le support solide, et a de préférence la structure

(Ic')



5

(I'b) représente un composé de formule telle que définie plus haut,

n est un nombre entier allant de 4 à 100,

m est un nombre entier allant de 4 à 100,

10 y est un nombre entier allant de 2 à 12,

y' est un nombre entier allant de 0 à 12,

p vaut 0 ou 1 si y' est différent de 0 et, si y' vaut 0 alors p vaut 0,

y'' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, si p vaut 0 alors y'' vaut

0,

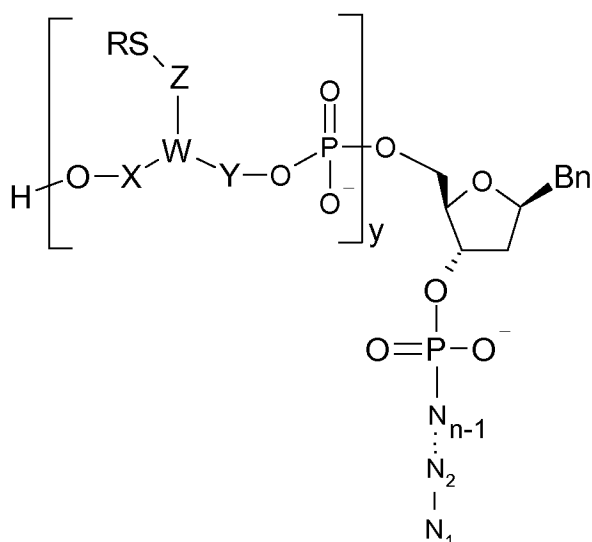
15 la somme des entiers (y + y' + y'') n'est pas supérieure à 12.

Le retrait du support s'effectue par un procédé classique connu de l'homme du métier, de préférence par un traitement du composé (XIIIa) avec de l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH).

20

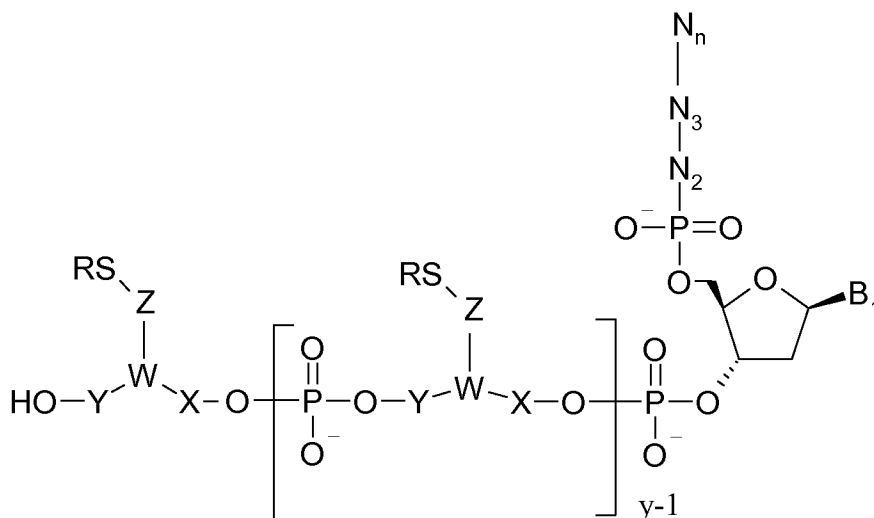
Selon un mode de réalisation de la présente invention, dans le cas où p=0, l'oligonucléotide modifié répond à la formule développée (XIIb) :

(XII b)



dans laquelle n , y , N_1, \dots, N_{n-1} , X , Y , Z , W et R ont la même définition que ci-dessus, et B_n représente la base du n -ième nucléotide.

- 5 Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, dans le cas où $p=0$, l'oligonucléotide modifié répond à la formule développée (XIIIb) :
- (XIII b)

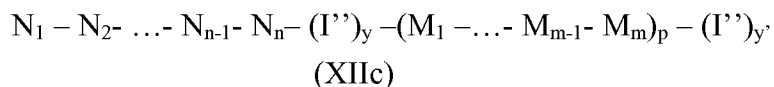


- 10 dans laquelle n , y , N_2, \dots, N_n , X , Y , Z , W et R ont la même définition que ci-dessus, et B_1 représente la base du 1er nucléotide.

- Un autre objet de la présente invention concerne les oligonucléotides modifiés (XIIc) et (XIIIc) obtenus respectivement à partir des composés (XIIa) et (XIIIa) par
- 15 déprotection de la fonction thiol et coupure de la liaison reliant le composé au support solide (Figures 3 et 4 respectivement).

Dans le cas où l'oligonucléotide est modifié par un ou plusieurs composés thiol de type (Ia), après déprotection de la fonction thiol et de la fonction phosphoramidite du composé (XIIa) par un traitement connu de l'homme du métier, le composé de

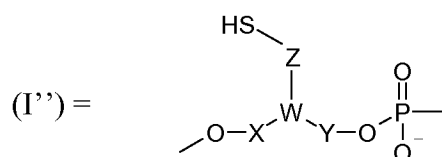
5 formule (XIIc) est obtenu :



dans laquelle,

N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

10 M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,



15 n est un nombre entier allant de 4 à 100,

m est un nombre entier allant de 4 à 100,

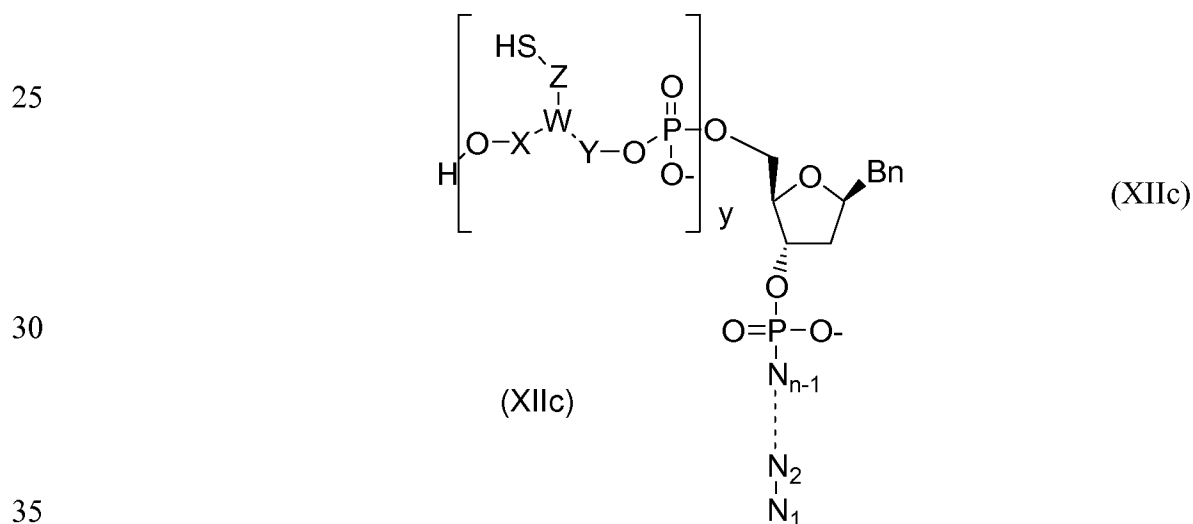
y est un nombre entier compris allant de 2 à 12,

p représente 0 ou 1,

y' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, y' est égal à 0 si p vaut 0,

20 la somme des entiers $(y + y')$ n'étant pas supérieure à 12.

ou en formule développée dans le cas où $p=0$:



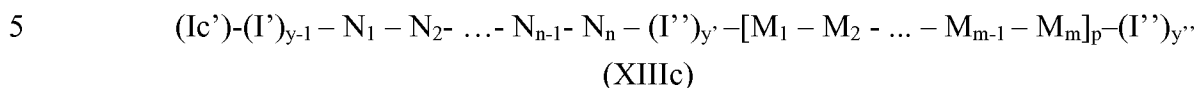
dans laquelle,

X, Y, W, Z, R_1 ont la même définition que pour le composé (I),

N_1, \dots, N_n, n, y ont la même définition que pour le composé (XIIa),

Bn représente une base classiquement utilisée dans une chaîne nucléotidique.

Dans le cas où l'oligonucléotide est modifié par un ou plusieurs composés thiol de type (Ib), après déprotection de la fonction thiol du composé (XIIIa) par un traitement connu de l'homme du métier, le composé de formule (XIIIc) est obtenu :

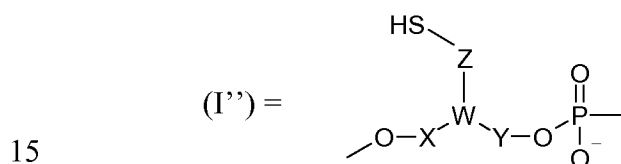


dans laquelle,

N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

10 (Ic') représente le composé obtenu à partir de (Ic) par coupure de la liaison ester avec le support solide,



n est un nombre entier allant de 4 à 100,

m est un nombre entier allant de 4 à 100,

y est un nombre entier allant de 2 à 12,

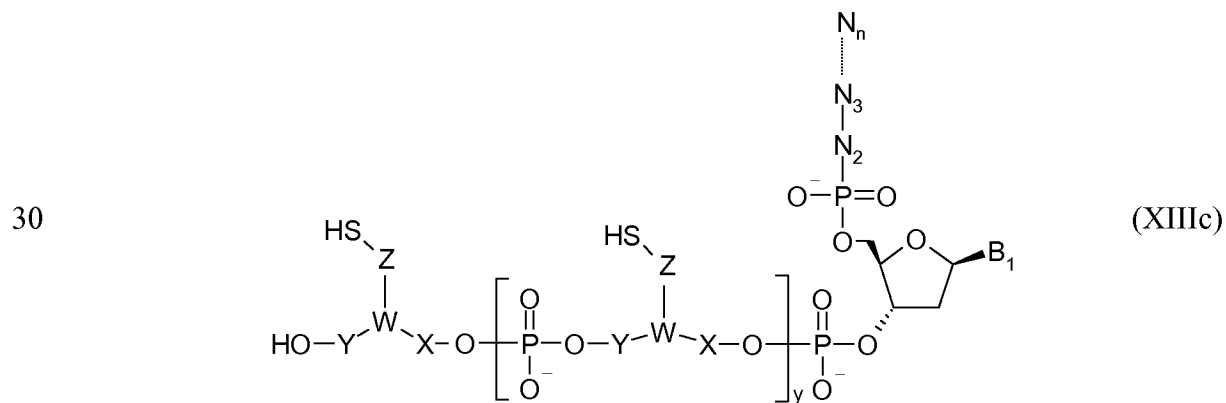
y' est un nombre entier allant de 2 à 12,

20 p vaut 0 ou 1 si y' est différent de 0 et, si y' vaut 0 alors p vaut 0,

y'' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et, si p vaut 0 alors y'' vaut

la somme des entiers $(y + y' + y'')$ n'étant pas supérieure à 12.

25 ou en formule développée dans le cas où $y' = p = 0$:



35 dans laquelle,

X, Y, W, Z ont la même définition que pour le composé (I),

N_2, \dots, N_n , n et y ont la même définition que pour le composé (XIIa),

B_n correspond à une base classiquement utilisée dans une chaîne nucléotidique.

5 Lors de la synthèse de l'oligonucléotide, la fonction thiol est de préférence protégée. En effet, la fonction thiol peut réagir avec la fonction phosphoramidite entrante.

L'étape de déprotection des fonctions thiol et d'élimination du support solide peut s'effectuer en une seule étape de traitement de l'oligonucléotide modifié (XIIa) ou (XIIIa).

10

L'élimination du support solide peut également s'effectuer dans une première étape puis la déprotection des fonctions thiol est ensuite effectuée dans une seconde étape.

15

L'oligonucléotide final (XIIC) (respectivement l'oligonucléotide final (XIIIC)) est obtenu indépendamment du composé thiol de départ, que ce soit à partir du composé (Ia) ou du composé (Ib). En effet, quelque soit le monomère (Ia) ou (Ib) utilisé, l'unité monomère thiol résultant de la réaction d'oligomérisation correspond au composé (I'') décrit précédemment.

20

Les supports greffés de formules (XVI)_k décrits ci-dessus permettent d'amorcer la synthèse d'oligonucléotides. On peut notamment prévoir de préparer de façon industrielle ou semi-industrielle des supports solides greffés par des séquences d'oligomères qui seront employées comme séquence polythiol en position 3' d'un oligonucléotide.

25

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) et, éventuellement, la séquence de nucléotides (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) de l'oligonucléotide modifié de l'invention, tel que décrit ci-dessus sont spécifiques d'un virus, d'une bactérie ou d'un gène responsable ou impliqué dans une maladie.

30

Au sens de la présente demande, par « spécifique », il est entendu que la séquence (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) et éventuellement, la séquence (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) sont complémentaires de tout ou partie d'au moins une séquence d'acide nucléique cible comprise dans un gène ou dans le génome d'un virus ou d'une bactérie, et caractéristique de ces derniers. Il est ainsi entendu que l'hybridation de la séquence (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) et éventuellement, de la séquence (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) avec la

35

partie ou la totalité de la séquence cible qui lui correspond conduit à la formation d'un duplex d'acides nucléiques possédant au plus 2 mésappariements. Dans un mode de réalisation de l'invention, le terme « spécifique » signifie que le duplex formé ne comprend qu'un seul ou deux mésappariements. Avantageusement, le duplex formé ne contient aucun mésappariement. Par « séquence caractéristique d'un gène ou du génome d'un virus ou d'une bactérie », il est entendu une région génomique, chromosomique ou plasmidique d'un organisme, d'un virus ou d'une bactérie, présentant un agencement de nucléotides qui n'est pas retrouvé dans les autres organismes, en raison de variations génétiques uniques.

10

Dans le cadre de l'invention, les termes « oligonucléotide modifié » et « sonde » sont utilisés indifféremment et désignent un oligonucléotide de 4 à 100 nucléotides et possédant au moins 2 fonctions thiol, tel que décrit ci-dessus. Avantageusement, lorsqu'il est utilisé pour le génotypage, l'oligonucléotide modifié de l'invention comprend de 13 à 20 nucléotides, avantageusement 14 ou 15 nucléotides. La sonde possède donc la capacité de se greffer sur une surface appropriée, telle qu'une surface revêtue d'or ou de groupements maléimide, et possède également la capacité de s'hybrider, *via* sa partie nucléotidique, avec une séquence nucléotidique cible.

De préférence, l'oligonucléotide modifié de l'invention comprend de 2 à 12 fonctions thiol, en particulier entre 2 et 8 fonctions, c'est-à-dire que l'oligonucléotide modifié peut comprendre 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 fonctions. De préférence, l'oligonucléotide modifié destiné à être greffé sur une surface d'or comprend entre 3 et 8, avantageusement entre 4 et 8 fonctions thiol. L'oligonucléotide modifié destiné à la conjugaison avec une surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide comprend avantageusement entre 2 et 8 fonctions thiol, et préférablement 4 fonctions thiol.

Le terme « séquence cible », tel qu'utilisé dans le cadre de l'invention, désigne une séquence complémentaire ou partiellement complémentaire à la sonde de l'invention, et qui est amplifiée à partir d'un gène ou du génome d'un virus ou d'une bactérie, et de préférence à partir d'une région caractéristique de ces derniers.

Le terme « virus » désigne une entité biologique nécessitant une cellule-hôte pour se répliquer, et se composant au minimum d'un acide nucléique et de protéines, l'acide nucléique pouvant être de l'ADN et/ou de l'ARN, simple ou double-brin. Les virus

comprennent ceux capables de parasiter les procaryotes (par exemple les Myoviridae, les Siphoviridae, les Podoviridae, les Microviridae et les Inoviridae), ceux capables de parasiter les plantes (phytovirus tel que le tobamovirus), les insectes (par exemple les baculovirus), les champignons, et l'homme. Dans le cadre de l'invention, les virus

5 comprennent également les arbovirus. Les arbovirus rassemblent des virus morphologiquement hétérogènes appartenant à plusieurs genres distincts comprenant plus particulièrement les genres *Flavivirus* (famille *Flaviviridae*), *Alphavirus* (famille *Togaviridae*), *Coltivirus* (famille *Reoviridae*), *Phlebovirus* (famille *Bunyaviridae*). Plus largement la famille des *Flaviviridae* comprend notamment les

10 genres *Flavivirus* (virus de la fièvre jaune, virus du Nil occidental (West Nile virus), virus de l'encéphalite à tique (TBE), virus de l'encéphalite japonaise, virus de l'encéphalite de Saint-Louis, virus usutu et virus de la Dengue), *Hepacivirus* (virus de l'hépatite C) et *Pestivirus* (virus de la diarrhée virale bovine (BVD), virus de la peste porcine). La famille des *Togaviridae* comprend notamment les genres *Alphavirus*

15 (virus de Sindbis, virus de Ross River, virus O'nyong'nyong, virus du Chikungunya) et *Rubivirus* (virus Rubella, virus de la rubéole). La famille des *Reoviridae* comprend notamment les virus affectant le système digestif (tel que le *Rotavirus*), ou le système respiratoire. La Famille des *Bunyaviridae* comprend notamment les genres *Hantavirus* (Hantavirus pulmonary syndrome, Korean hemorrhagic fever), *Nairovirus* (*Dugbe virus*), *Orthobunyavirus* (*Bunyamwera virus*), *Phlebovirus* (*Fièvre de la vallée du Rift*) et *Tospovirus*.

20

Dans le cadre de l'invention, les virus capables d'infecter l'homme comprennent les *Vesiculovirus* (virus de la stomatite vésiculeuse, ..), les *Lyssavirus* (virus de la Rage, virus de la chauve souris australienne,). les *Picornavirus* (*Rhinovirus*, *Poliovirus*, virus de l'hépatite A...), les *Herpesvirus* (varicelle, zona, cytomegalovirus CMV, virus Epstein Barr EBV ...), les *Orthomyxovirus* (virus de la grippe ...), les *Paramyxovirus* (virus de la rougeole, virus des oreillons ...), les *Poxvirus* (virus de la variole ..), *Coronavirus* (SRAS), les *Filovirus* (Ebola ...) , les *Hepadnavirus* (VHB) et les Retrovirus (HIV, HTLV...) .

25

30

Le terme « bactérie » désigne tout organisme vivant procaryote se caractérisant par une absence de noyau et d'organites, et pourvu d'une paroi cellulaire. Ce terme comprend notamment les bactéries susceptibles d'être pathogènes et de causer des maladies et/ou des infections chez l'humain, telles que *Corynebacterium diphtheriae*

35 (diphtérie), *Treponema pallidum* (syphilis), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Mycobacterium leprae* (lèpre), *Neisseria gonorrhoeae* (gonorrhée), les *Rickettsia* (typhus), *Clostridium tetani* (tétanos), *Vibrio cholerae* (choléra),

Pseudomonas aeruginosa et les *Staphylococcus* (pathogènes opportunistes). Ce terme comprend également les bactéries impliquées dans les risques transfusionnels et dans les infections nosocomiales telles que, par exemple, les bactéries Gram-négatif *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, et *Pseudomonas aeruginosa*, ou les bactéries à Gram-positif *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* et *Clostridium perfringens*.

- 10 Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides ($N_1-N_2-\dots-N_{n-1}-N_n$) et, éventuellement, la séquence de nucléotides ($M_1-M_2-\dots-M_{m-1}-M_m$) sont choisies parmi :
- les séquences de SEQ ID NO : 1, de SEQ ID NO : 4, de SEQ ID NO : 27, de SEQ ID NO : 28, de SEQ ID NO : 35 ou de SEQ ID NO : 36, spécifiques du virus de l'hépatite C (VHC),
 - 15 - les séquences de SEQ ID NO : 16, de SEQ ID NO : 17 ou de SEQ ID NO : 40, spécifiques des flavivirus,
 - la séquence de SEQ ID NO : 18 ou de SEQ ID NO : 41, spécifique du virus de la Dengue, ou
 - 20 - la séquence de SEQ ID NO : 19, spécifique du West Nile virus (WNV).

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides ($N_1-N_2-\dots-N_{n-1}-N_n$) et, éventuellement, la séquence de nucléotides ($M_1-M_2-\dots-M_{m-1}-M_m$) ont une structure de type anomère alpha, anomère bêta, linéaire, ou « snail ». Lorsque la

25 séquence de nucléotides a une structure de type anomère bêta, l'oligomère modifié de l'invention (dont les thiols sont situés en 5') s'hybride de manière antiparallèle avec la séquence cible. Lorsque la séquence de nucléotides a une structure de type anomère alpha, l'oligomère modifié de l'invention (dont les thiols sont situés en 3') s'hybride de manière parallèle avec la séquence cible.

30

Fonctionnalisation de surface

Les oligonucléotides modifiés selon l'invention peuvent être déposés sur un substrat afin de fonctionnaliser la surface de ce substrat. Le substrat peut être métallique ou bien en polymère, conducteur ou non conducteur. Il peut être plan (en

35 partie ou dans sa totalité) ou courbe, et peut avantageusement prendre une forme sphérique.

Selon un mode de réalisation, le substrat est non planaire, par exemple sous forme de microparticules ou nanoparticules. Les oligonucléotides modifiés selon l'invention peuvent alors être greffés sur ces microparticules ou nanoparticules. De préférence, ces particules sont magnétiques. En effet, ces particules magnétiques peuvent alors être facilement amenées à la surface d'une électrode ou au fond des puits d'une microplaque, en vue d'un test de détection, de génotypage ou de séquençage, par application d'un aimant. La mise en œuvre d'un support non planaire de type microparticule ou nanoparticule dans le cadre de la méthode de détection de l'invention permet avantageusement d'augmenter la superficie de la surface sur laquelle peuvent se greffer les oligonucléotides modifiées de l'invention, et permet ainsi d'augmenter la proportion d'hybridations entre les sondes et les séquences cibles.

Selon un mode de réalisation, le substrat est métallique, par exemple en cuivre ou en titane, et est recouvert partiellement ou sur toute sa surface d'un film d'or ou de platine, de préférence d'or.

Selon un mode de réalisation, le substrat est en polymère, de préférence un polymère conducteur.

Selon un mode de réalisation, le substrat peut comporter des zones de réception recouvertes d'un film d'or ou de platine ou recouvertes de fonctions alcényles, alcynyles ou halogénoacétamide, telles que des fonctions maléimide ou acrylamide, sur lesquelles l'oligonucléotide modifié est déposé.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les groupements comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone sont choisis parmi les alcènes activés par une fonction carbonyle en alpha, de préférence les alcènes sont choisis parmi les groupements maléimide et acrylamide.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les groupements halogénoacétamide sont choisis parmi les groupements bromoacétamido et iodoacétamido.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les groupements comportant au moins une triple liaison carbone-carbone sont choisis parmi les alcynes activés par une fonction carbonyle en alpha, de préférence les alcynes sont choisis parmi les groupements 2-propynamide.

Comme illustré sur la figure 16a, dans laquelle le composé gpt – SH représente l'oligonucléotide modifié selon l'invention, la fonction thiol réagit avec la double liaison carbone-carbone ou la triple liaison carbone-carbone activée par une fonction

carbonyle en alpha. Du haut vers le bas de la figure 13a, la première réaction de fonctionnalisation correspond à une surface greffée maléimide, la seconde réaction correspond à une surface greffée acrylamide, la troisième réaction correspond à une surface greffée iodoacétamido ou bromoacétamido et la quatrième réaction correspond à une surface greffée 2-propynamide effectuée dans le cas d'un oligonucléotide modifié selon l'invention comprenant deux composés thiols.

Dans le cas de la figure 16b, la surface est greffée par des groupements alcényles (1^{ère} réaction) et alcynyles (2^{nde} réaction) non activés. La réaction entre la fonction thiol de l'oligonucléotide modifié et les groupements de surface s'effectue à l'aide d'une activation lumineuse ($\lambda = 265 \text{ nm}$). La première réaction de fonctionnalisation est effectuée à l'aide d'un oligonucléotide modifié monothiol schématiquement représenté par gpt – SH et la seconde réaction est effectuée à l'aide d'un oligonucléotide modifié dithiol.

Dans le cas où le support est greffé par des fonctions alcynyles, la fonctionnalisation de surface par un oligonucléotide modifié polythiol est très intéressante car elle conduit à une structure cyclique grâce à deux réactions successives entre une première fonction thiol et la fonction –yne dans une première étape puis entre une deuxième fonction thiol et la fonction –ène résultante dans une seconde étape (figures 16a et 16b).

Selon un mode de réalisation préféré, le substrat est greffé par des groupements maléimide ou acrylamide.

Ainsi, l'invention permet par exemple de fonctionnaliser une surface d'or par création de liaison(s) or-soufre entre la surface du substrat et l'oligonucléotide modifié ou bien de fonctionnaliser une surface greffée par des fonctions maléimide ou acrylamide par création de liaison(s) thioethers.

La fixation des oligonucléotides modifiés à la surface du substrat s'effectue en trempant la surface à traiter dans une solution comprenant l'oligonucléotide modifié selon l'invention tel que décrit plus haut. On prévoit généralement ultérieurement une ou plusieurs étapes de lavage et de séchage. En général, la solution d'oligonucléotides modifiés est à une concentration comprise entre 0,10 μM et 500 μM , de préférence entre 0,5 μM et 100 μM lorsque la surface du substrat est en or et entre 50 nM et 200 nM, de préférence entre 75 nM et 150 nM lorsque la surface du substrat est formée de maléimide. Le trempage est suivi d'un lavage pour éliminer ce qui n'a pas réagi.

La présence de plusieurs atomes de soufre sur l'oligonucléotide permet de créer plusieurs liaisons or-soufre, ou plusieurs liaisons thioether, ce qui permet de stabiliser l'oligonucléotide sur la surface.

5 Un objet de l'invention comprend donc un substrat greffé par au moins un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus, ledit substrat comportant au moins une zone de réception revêtue d'une substance tolérant le greffage dudit oligonucléotide modifié. Selon un mode de réalisation de l'invention, le substrat a la forme d'une électrode. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le substrat a
10 la forme d'une microplaque possédant 96 puits ou plus.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le substrat greffé selon l'invention est en métal, de préférence en cuivre ou en titane, et comprend au moins une zone de réception revêtue d'un film d'or ou de platine. Selon un autre mode de réalisation de
15 l'invention, le substrat greffé est en plastique, de préférence en polystyrène et la zone de réception est revêtue de groupements maléimide et/ou comporte à sa surface au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide.

20 Selon un mode de réalisation de l'invention, la densité de greffage de l'oligonucléotide modifié selon l'invention obtenue sur la zone de réception résulte de l'utilisation de solutions de greffage de 10 nM par puits à 500 nM par puits, lorsqu'une plaque 96 puits est utilisée comme substrat. Avantageusement, la densité de greffage de l'oligonucléotide modifié selon l'invention sur la zone de réception du
25 substrat est obtenue en utilisant une solution de greffage de 100 nM par puits lorsqu'une plaque 96 puits est utilisée comme substrat.

Fixation à des marqueurs ou ligands

Les oligomères modifiés de la présente invention peuvent également être liés par
30 un ou plusieurs points d'attachement à des marqueurs ou des ligands pouvant être par exemple, des marqueurs enzymatiques, chromogènes, fluorogènes, radioactifs, ou chimiluminescents, des métaux, des ions métalliques, des hormones, des protéines, des peptides, des saccharides, oligosaccharides, des agents nucléolytiques ou protéolytiques, des agents de liaison, tels qu'une biotine, un antigène, un haptène, un
35 anticorps ou un récepteur. Avantageusement, ce marqueur ou ligand permet de détecter l'évènement d'hybridation entre l'oligonucléotide modifié de l'invention et une séquence cible représentative d'un gène, d'un virus ou d'une bactérie.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le marqueur ou ligand se lie à la séquence nucléotidique cible représentative d'un gène, d'un virus ou d'une bactérie, et permet de détecter l'évènement d'hybridation entre l'oligonucléotide modifié de l'invention et la séquence cible.

5

Méthode de détection

Un autre objet de la présente invention concerne une méthode de détection d'au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique, comprenant une étape de détection dudit acide nucléique cible avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus.

10

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode de détection comprend les étapes :

15

- d'obtention d'au moins un acide nucléique « source » à partir d'un échantillon biologique,
- de production d'un amplicon par amplification d'un acide nucléique cible à partir de l'acide nucléique source, et
- de détection de l'hybridation entre l'amplicon et au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus.

20

Par « échantillon biologique », il est entendu toute substance contenant ou suspectée de contenir un acide nucléique, tel que l'ADN ou l'ARN, et obtenue à partir d'un humain, d'un animal, d'un végétal ou de toute composition liquide ou solide.

25

L'échantillon biologique inclut par exemple les échantillons de tissus ou de fluides isolés à partir d'un individu ou d'individus, comprenant mais ne se limitant pas à la peau, le sang, le plasma, le sérum, le fluide spinal, le fluide lymphatique, le fluide synovial, l'urine, les larmes, les cellules sanguines, la moelle osseuse, les organes, les tumeurs, ainsi que les échantillons de constituants de cultures cellulaires *in vitro*.

30

L'échantillon biologique peut être avantageusement traité pour détruire la structure des tissus ou des cellules, afin d'en placer les constituants intracellulaires en solution.

Par « amplicon », il est entendu une molécule d'acide nucléique générée pendant une procédure d'amplification d'une séquence nucléique cible caractéristique du gène, du virus ou de la bactérie contenus dans l'échantillon biologique. Selon un mode de réalisation de l'invention, l'amplicon est généré par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase chain reaction », ou PCR).

35

L'amplicon utilisé dans la méthode de détection de l'invention possède avantageusement une taille allant de 75 pb à environ 500 pb. Il apparait notamment qu'un des avantages de la méthode de l'invention réside dans la possibilité d'utiliser des amplicons ayant une longueur d'une ou de plusieurs centaines de nucléotides, ce qui se révèle impossible dans les méthodes de détection connues dans l'état de la technique. La méthode de détection de l'invention permet ainsi de sélectionner et d'amplifier des séquences cibles plus grandes dans les gènes, virus ou bactéries.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode de détection permet de déterminer le génotype et/ou le sous-type d'un virus présent dans un échantillon biologique. L'amplicon est plus spécifiquement généré par amplification d'une séquence nucléotidique cible, correspondant à une région génomique du virus portant des informations relatives au génotype et/ou au sous-type viral, et la détection est effectuée avec une sonde spécifique d'un génotype et/ou d'un sous-type viral particulier. La méthode de l'invention rend ainsi possible d'effectuer la détection sur la base de séquences cibles contenant plus d'informations sur le type, ou le sous-type viral ou bactérien. Cet avantage résulte directement de l'oligonucléotide modifié selon l'invention, de son mode et de sa capacité de fixation à la zone de fixation du substrat. Avantageusement, il n'est donc plus indispensable de définir des amorces permettant d'amplifier une séquence cible la plus courte possible à partir du génome viral ou bactérien. La méthode de la présente invention permet au contraire de sélectionner des amorces localisées dans des régions conservées dans les familles de virus ou de bactéries visées, et d'amplifier des séquences cibles plus longues. Il en résulte des économies significatives et une facilité d'utilisation accrue dans la mesure où les mêmes amorces peuvent être utilisées pour amplifier une zone génomique retrouvée dans plusieurs types et/ou sous-type viraux ou bactériens, sans craindre de voir les résultats de l'hybridation faussés par la taille de l'amplicon utilisé.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'étape de production de l'amplicon de la méthode de détection de l'invention est réalisée avec un mélange d'amorces nucléotidiques, de préférence choisies parmi les couples d'amorces :

- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9, lorsque l'amplicon est généré à partir du VHC, quelque soit le génotype viral impliqué. Ce couple d'amorces est générique et permet d'amplifier un amplicon « long » de 401 nt à partir de tout génotype de VHC ;
- SEQ ID NO : 10 et SEQ ID NO : 9, un couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 191 nt spécifiques du génotype 1a/1b ;

- SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 9, un couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 108 nt spécifiques du génotype 2 ;
 - SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 11, un couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 143 nt spécifiques du génotype 3a ;
 - 5 - SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 30, un couple permettant la génération d'amplicons « courts » de 175 nt spécifiques du génotype 4a/4d ; et
 - SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21, et/ou SEQ ID NO : 22 et SEQ ID NO : 21 lorsque l'amplicon est généré à partir d'un flavivirus.
- 10 Selon un mode de réalisation, l'oligonucléotide modifié selon l'invention est utilisé dans la méthode de détection à une densité résultant de la mise en contact d'une solution de greffage allant de 10 nM à 500 nM avec un puits, lorsqu'une plaque 96
- 15 puits est utilisée comme substrat. Avantageusement, la solution de greffage de l'oligonucléotide modifié selon l'invention est de 100 nM, lorsqu'une plaque 96 puits est utilisée comme substrat. Lorsque l'oligonucléotide modifié selon l'invention
- 20 comporte 2 fonctions thiol, la solution de greffage utilisée possède une concentration en oligonucléotide modifié d'au moins 10nM (lorsqu'une plaque 96 puits est utilisée comme substrat) et la concentration de l'amplicon utilisé dans la méthode de détection est d'au moins 100pM. Lorsque l'oligonucléotide modifié selon l'invention comporte
- 25 4 fonctions thiol, la solution de greffage utilisée possède une concentration en oligonucléotide modifié d'au moins 10nM par puits et la concentration de l'amplicon utilisé dans la méthode de détection est d'au moins 10pM par puits, lorsqu'une plaque 96 puits est utilisée comme substrat.
- 30 La méthode de détection selon l'invention présente un avantage particulier pour le génotypage du VHC, en ce qu'elle permet notamment de distinguer les différents génotypes et sous-types connus du VHC, en mettant en œuvre un test de détection moléculaire simple.
- 35 Les infections liées au virus de l'hépatite C représentent en effet un problème de santé extrêmement important dans la mesure où les individus infectés présentent le risque de développer des maladies du foie, des cirrhoses, et des carcinomes hépatiques primaires, et qu'ils constituent également un réservoir infectieux. Les études épidémiologiques prévoient un triplement du nombre de morts annuelles résultant du VHC au cours des 10 prochaines années si de nouveaux systèmes diagnostiques et thérapeutiques ne sont pas développés.

Caractérisé par une forte variabilité génétique, le VHC est classifié en 6 génotypes majeurs, comprenant plus de 80 sous-types. La détermination précise du génotype et/ou du sous-type infectieux ont des conséquences cruciales pour les stratégies thérapeutiques, et permettent de prédire l'efficacité de la réponse antivirale et de définir la durée de la thérapie, ainsi que le type et le dosage du traitement. L'identification de la classification précise des VHC trouvés chez les individus infectés est également importante pour le suivi épidémiologique, dans le but de surveiller la distribution des souches virales et d'identifier les facteurs de transmission.

10

De nombreux tests de détection et/ou de quantification d'ARN du VHC disponibles commercialement reposent sur les séquences trouvées dans la région 5' non codante (ou 5'NCR, pour « noncoding region ») qui constitue l'une des régions les plus conservées et les mieux caractérisées du VHC. La région 5'NCR est ainsi choisie comme cible dans les différentes méthodes de génotypage connues et distribuées commercialement, telles que le test INNO LiPA HCV II, de Bayer, le kit Trugene HCV 5'NCR de Bayer /Siemens Healthcare (WO2007/076493), basé sur l'analyse de séquence et le test de mobilité de duplex (« duplex mobility test »), ou un système de détection d'hybridation comprenant une pluralité de typage VHC dessinées dans la région 5'NCR ou dans la région NS5 développé par Roche Molecular Systems (US 2007/014160).

20

Toutefois, la présence de mutations dans la région 5'NCR conduit à une mauvaise classification des génotypes VHC dans 5 à 8% des cas, entraînant de graves conséquences sur les résultats du traitement. La région 5'NCR ne semble pas non plus présenter un degré de fiabilité suffisant pour identifier les génotypes 2 et 4 du virus.

25

La méthode de référence pour effectuer le génotypage du VHC réside en outre dans le séquençage de régions spécifiques du VHC, et notamment de la région NS5b du virus, codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante. Toutefois, le séquençage se révèle coûteux et long, et requiert un équipement spécialisé et des opérateurs qualifiés. Il ne se trouve donc pas approprié pour mener des études cliniques à grande échelle.

30

Il existe donc un besoin pour des méthodes de détection et/ou de génotypage améliorées du VHC permettant de distinguer les différents génotypes et sous-types connus du VHC, en mettant en œuvre un test moléculaire simple, tel que celui de l'invention.

35

Un autre objet de la présente invention concerne un oligonucléotide possédant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 27, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 35, SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO : 40 et SEQ ID NO : 41. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 1 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 1a/1b et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 27 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 2 et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 35 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 2a/2c et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 36 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 2b et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 4 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 3a et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 28 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les VHC de type 4a/4d et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 17 ou SEQ ID NO : 40 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les flavivirus et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 18 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les virus de la Dengue et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 41 correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les virus de la Dengue de sérotype 4, et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus. Avantageusement, l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO : 19

correspond à une séquence nucléotidique retrouvée spécifiquement chez les West Nile virus et permet de détecter spécifiquement ces derniers dans le cadre d'une méthode de détection telle que décrite ci-dessus.

5 Kits de détection

Un autre objet de l'invention consiste en un kit de détection et/ou de diagnostic comportant au moins un support comportant au moins une zone de réception, sur laquelle est placé au moins un oligonucléotide modifié selon l'invention.

10 Ainsi, le kit de détection peut être utilisé pour le criblage de molécules biologiquement actives ou pour des tests de diagnostic ou de séquençage. On peut prévoir que le kit de diagnostic comporte plusieurs zones de réception distinctes, sur lesquelles un support solide greffé par des oligonucléotides identiques ou distincts est déposé. Par exemple, des supports solides greffés par des oligonucléotides modifiés identiques ou distincts peuvent être placés sur des zones de réception distinctes d'un
15 substrat recouvert d'un film d'or ou d'un substrat greffé par des fonctions comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide de façon à former un support de test et/ou de diagnostic.

Le support peut notamment être une électrode d'or. Le kit de test peut
20 avantageusement comprendre une cellule électrochimique comportant une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. L'électrode de travail peut être en or, la contre-électrode en platine et l'électrode de référence en argent. L'étude de l'interaction d'un oligonucléotide modifié avec une molécule à tester peut comporter une étape de voltampérométrie cyclique.

25 Le greffage avec une surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone (fonction alcényle) ou une triple liaison carbone-carbone (fonction alcynyle) ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide peut par exemple être utilisé pour des applications dans le domaine du
30 diagnostic en format microplaque et/ou pour la mise en œuvre de tests de type ELOSA (« Enzyme-Linked OligoSorbent Assay » en anglais ou « dosage d'oligoadsorption par enzyme liée » en français). Au cours de ce type de test, la surface des puits est greffée par des fonctions alcényle, alcynyle ou halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide 1. Puis, la surface est mise en contact avec des
35 oligonucléotides modifiés selon l'invention. Ainsi, une ou plusieurs liaisons thioether se forment grâce à la présence d'une ou de plusieurs fonctions thiol sur les oligonucléotides selon l'invention. Puis, le test consiste à mettre en contact un

échantillon à tester comprenant une séquence nucléotidique cible avec les puits ainsi fonctionnalisés, pour notamment mesurer l'hybridation des oligonucléotides. La mesure peut par exemple se faire par fluorescence grâce à un marquage des chaînes d'oligonucléotides.

5

L'invention concerne également l'utilisation d'un oligonucléotide modifié tel que décrit ci-dessus et comportant au moins deux fonctions thiol pour le greffage sur surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide. Selon un mode de réalisation, le composé peut comporter trois ou quatre fonctions thiol. L'oligonucléotide modifié immobilisé sur la surface comportant au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide, par l'intermédiaire d'au moins deux fonctions thiol présente une très bonne stabilité pour une utilisation dans un test diagnostic, tel qu'un test de type ELOSA, ainsi qu'une meilleure disponibilité vis-à-vis des cibles. Lorsque le nombre de fonctions thiol dans le composé augmente, le nombre d'hybridations sur l'ensemble du support greffé lors du test de détection augmente. Ainsi, un oligonucléotide modifié présentant quatre fonctions thiol permet d'obtenir une hybridation de la cible plus efficace.

20

EXEMPLES

Dans les exemples, on entend par « sonde », une chaîne d'oligonucléotides comprenant au moins un composé thiol selon l'invention destinée à être immobilisée sur une surface.

25

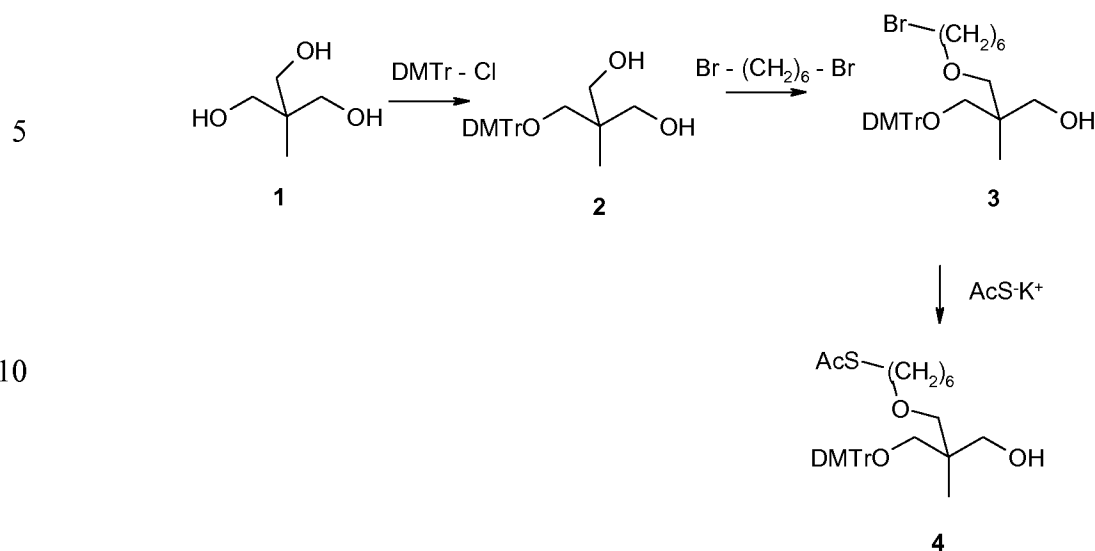
On entend par « cible », une chaîne d'oligonucléotides destinée à s'hybrider avec la sonde, par exemple, lors d'un test de diagnostic.

Exemple 1 : Synthèse d'un oligomère

30

Synthèse du composé 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2-(6-S-acétylthiohexyloxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol 4

35



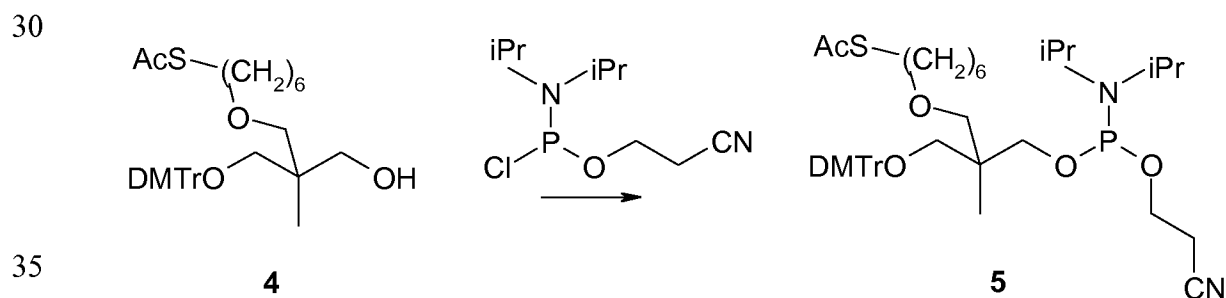
15 Le composé **3** est obtenu à partir du composé **1** en suivant le protocole décrit dans Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J. J., and Morvan, F., *Journal of Organic Chemistry* 74, **2009**, 1218-1222.

A une solution de 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2-(6-bromohexyloxyméthyl)-2-méthyl-1,3-propanediol **3**, (556 mg, 0,95 mmol) et de thioacétate de potassium (162 mg, 1,42 mmol) dans du toluène anhydre (10 mL) on ajoute de l'éther couronne 18-6 (70 mg, 0,26 mmol). Le mélange est agité magnétiquement 2 heures à 50 °C. Après dilution avec du dichlorométhane (150 mL) le mélange est filtré et la phase organique lavée avec de l'eau (2 × 50 mL) puis séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation, le brut de réaction est purifié par chromatographie sur silice (0 à 30% d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane) pour conduire au produit désiré sous forme d'une huile incolore (413 mg, 75%).

20

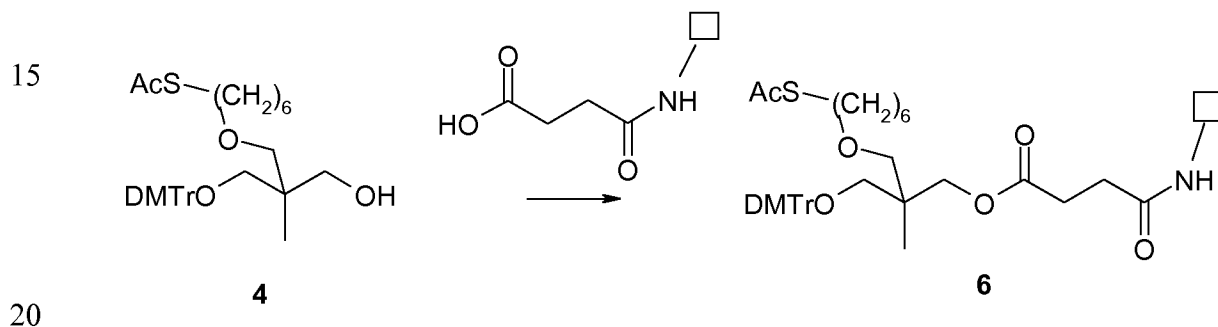
25

Synthèse du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2-(6-S-acétylthiohexyloxyméthyl)-2-méthyl-3-O-(2-cyanoéthyl-N,N'-diisopropylphosphoramidite)-propane-1,3-diol **5**



A une solution de 1-*O*-(4,4'-diméthoxytrityl)-2-(6-*S*-acétylthiohexyloxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol **4** (413 mg, 0,71 mmol) et de diisopropyléthylamine (186 μ L, 1,06 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) est ajouté du 2-cyanoéthyl-N,N'-diisopropylchlorophosphoramidite (190 μ L, 0,85 mmol). Le mélange est agité magnétiquement une heure à température ambiante. L'excès de réactif est neutralisé par addition de 500 μ L d'eau puis le mélange est dilué avec du dichlorométhane (150 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (100 mL), puis séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation, le brut est purifié par chromatographie sur silice (0 à 30% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane contenant 4% de triéthylamine) conduisant au composé **5** désiré sous forme d'une huile incolore (400 mg, 72%).

Synthèse du support solide thiol **6**



Dans un tube rodé, le 1-*O*-(4,4'-diméthoxytrityl)-2-(6-*S*-acétylthiohexyloxyméthyl)-2-méthyl-1,3-propanediol **4** (178 mg, 0,3 mmol) et la diméthylaminopyridine (DMAP 36 mg, 0,3 mmol) sont coévaporés avec 3 mL de pyridine anhydre. Puis on ajoute la succinyl-longue chaine alkylamine -CPG (Controlled Pore Glass) (1 g), la pyridine anhydre (5 mL), la triéthylamine anhydre (160 mL, 1,2 mmol) et l'éthyldiméthylaminopropyl carbodiimide (EDC, 280 mg, 2,0 mmol). Puis on rince avec 1 mL de pyridine anhydre. Le mélange est agité une nuit.

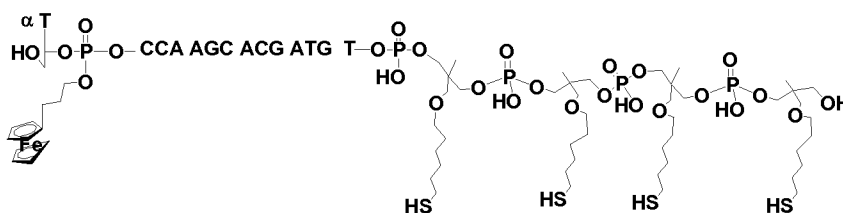
Le mélange est filtré et lavé avec CH₂Cl₂ (10 mL) puis séché au dessiccateur. Le composé thiol sur support solide est traité par une solution d'anhydride acétique, N-méthylimidazole, 2,6-lutidine dans le THF pendant 3h sous agitation. Le mélange est filtré et lavé avec CH₂Cl₂ (10 mL) puis séché au dessiccateur pour donner le support solide thiol **6** (940 mg) avec une fonctionnalisation de 29 μ mol/g.

Exemple 2 : Préparation d'oligonucléotides modifiés

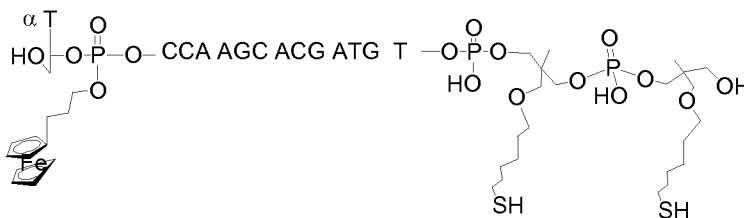
Trois oligonucléotides comprenant un groupement ferrocène en position 5' et un nombre croissant de composés thiol de type (Ia) selon l'invention (1, 2 et 4 composés

thiol) ont été synthétisés sur un synthétiseur d'ADN. Le groupement ferrocène a été utilisé afin de visualiser l'immobilisation de l'oligonucléotide sur la surface d'or par voltampérométrie cyclique. Un, deux ou quatre groupements thiol ont été introduits sur un support solide de type propanediol et la séquence ADN SEQ ID NO : 7 a été greffée. Enfin, une phosphoramidite alpha-thymidine portant un groupement ferrocène a été introduite en position 5' de l'oligonucléotide modifié. La déprotection qui suit s'effectue en deux étapes. D'abord, le milieu est traité avec 10% de pipéridine dans l'acétonitrile pendant 10 minutes afin d'éliminer le groupement cyanoéthyle par une bêta-élimination et l'acrylonitrile résultant est éliminé du milieu par un lavage à l'acétonitrile. Puis, un traitement à l'hydroxyde d'ammonium concentré permet d'éliminer les groupements protecteurs acyles sur les nucléobases et sur les fonctions thiol et permet d'hydrolyser le bras de liaison succinyle (support solide). Ce protocole permet d'éviter l'addition de Michael entre les fonctions thiol déprotégées et l'acrylonitrile. Après évaporation, l'oligonucléotide modifié non supporté est purifié par chromatographie HPLC en phase inverse sur colonne C18.

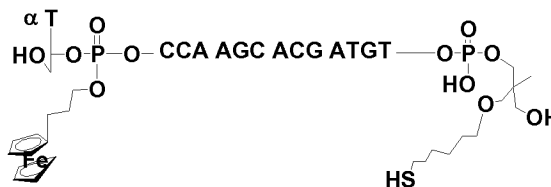
Tétrathiol (oligonucléotide modifié par 4 composés thiol)



Dithiol (oligonucléotide modifié par 2 composés thiol)



Monothiol (oligonucléotide modifié par 1 composé thiol)



Greffage et étude de stabilité des oligonucléotides modifiés (tétrathiol, dithiol et monothiol)

Pour cette étude, un potentiostat multivoies VMP3 Biologic (Biologic Science Instruments, Pont de Claix) a été utilisé. Les résultats ont été enregistrés à l'aide du logiciel EC-Lab de Biologic Science Instruments.

La cellule électrochimique est composée d'une électrode d'or de 0,28cm² de surface, d'une contre-électrode en platine et d'une électrode de référence Ag/AgCl.

Etape 1 : Réduction des groupements thiol

4nmol d'ODN-thiol (oligonucléotides modifiés avec un ou plusieurs composés thiol) sont réduits dans une solution de Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorure (TCEP,HCl, Sigma-Aldrich) (160mM) soit une concentration dans la solution de 20mM en TCEP,HCl, à 20°C, pendant 2h sous argon.

L'ODN est purifié par deux dilutions/centrifugations successives avec une solution de TCEP,HCl 20mM dégazée sur filtres amicon YM3000 (Millipore) 15min à 14000rcf (rcf = Relative Centrifugal Force). Après dilution dans 450µL de tampon phosphate 100mM dégazé, le milieu est de nouveau centrifugé sur filtres amicon YM3000, 30 min, 14000rcf.

Une solution de greffage contenant 4nmol d'ODN, 90mM en phosphate de sodium, 2mM en TCEP,HCl est obtenue.

Etape 2 : Activation de l'électrode d'or

L'électrode de travail d'or est nettoyée par un premier lavage dans l'acétone pendant 10 minutes aux ultra-sons. Une fois séchée la surface est plongée dans une solution « piranha » (H₂SO₄ 0,7mL, H₂O₂ 0,3mL) pendant 1 minute afin d'éliminer tout résidu organique de la surface.

Enfin l'activation basique de l'électrode consiste à nettoyer l'or en surface par production d'hydrogène à l'électrode par hydrolyse de l'eau dans la soude 0,5M dans les potentiels négatifs (-1,4V vs Ag/AgCl) pendant plusieurs cycles.

Etape 3 : Greffage de la sonde

Après rinçage, la solution de greffage contenant l'oligonucléotide thiol est mise au contact de l'électrode d'or activée, pendant trois jours sous atmosphère inerte.

Après rinçage, la cellule électrochimique est remplie avec l'électrolyte d'analyse (phosphate de sodium dibasique 10mM, phosphate de potassium monobasique 10mM, perchlorate de sodium 250mM, pH 6,5).

La surface est passivée par une solution de mercaptopropanol 1mM pendant 30 minutes, après rinçage la cellule est mise dans l'électrolyte d'analyse pendant 2h afin de stabiliser la couche greffée.

5 *Etape 4 : Analyse de la stabilité des composés greffés en surface*

Les analyses sont réalisées par voltampérométrie cyclique (CV) à 50mV/s ; entre -0,1V et 0,45V. Les études de stabilité de la couche greffée sont réalisées après une stabilisation du signal électrochimique pendant 2h en cyclant toutes les 30 minutes.

10 La cellule est remplie d'eau distillée dégazée à 60°C ou 80°C pendant 1 ou 5 minutes, après rinçage la cellule est remplie de 1,5mL d'électrolyte d'analyse phosphate (20mM) perchlorate (250mM). Après 30 minutes de stabilisation, une CV est réalisée.

L'opération est renouvelée autant que nécessaire.

15

Résultats

Une comparaison du taux de greffage des 3 oligonucléotides modifiés par des composés thiol (tétrathiol, dithiol et monothiol) a été réalisée. Le taux de greffage a été déterminé par intégration du pic d'oxydation du ferrocène. En effet, la charge d'électron transférée est directement liée au nombre de ferrocènes présents en surface de l'électrode, et donc au nombre de sondes greffées sur l'or.

20

Les résultats ci-dessous correspondent à la moyenne des taux de greffage de 3 greffages différents pour chaque sonde.

25

	molécules/cm ²
monothiol	5,21E+12
dithiol	5,81E+12
tétrathiol	1,40E+12

Un histogramme des résultats est représenté sur la figure 5.

30

Les taux de greffages pour le monothiol et dithiol sont assez comparables, nous pouvons observer un greffage moins important du tétrathiol probablement dû à l'encombrement plus important en accord avec le nombre de bras thiol. Malgré cette différence, le taux de greffage du tétrathiol reste important et il est très reproductible.

35

Une étude de stabilité des 3 oligonucléotides modifiés par des composés thiol vis-à-vis de la température a été menée dans de l'eau distillée dégazée. L'évolution de la réponse électrochimique a été suivie par voltampérométrie cyclique. Le

pourcentage de diminution d'intensité d'oxydation du ferrocène est calculé par rapport au signal obtenu après stabilisation.

Ces diminutions en fonction du temps sont reportées sur les figures 6 et 7.

La molécule tétrathiol est très stable vis-à-vis de traitements successifs dans de l'eau à 60°C (figure 6). En effet, après 5 fois une minute de ce traitement, il reste 97% du signal de départ, contrairement au monothiol (70% de signal de départ) et dithiol (62% de signal de départ).

A 80°C, la perte de signal est plus importante (figure 7). Après cinq traitements successifs d'une minute, 83% du signal de départ est encore quantifiable pour le tétrathiol. Ainsi, la stabilité du tétrathiol est bien supérieure à celle du monothiol (45% de signal résiduel) et celle du dithiol (18% de signal résiduel).

Cette étude montre le gain notable de stabilité du greffage thiol sur or par l'emploi d'un oligonucléotide modifié par 4 composés thiol (tétrathiol), en comparaison du greffage d'un monothiol ou d'un dithiol. Le manque de stabilité de ce dernier dithiol peut s'expliquer par une possible compétition entre le greffage sur or et la fermeture du cycle pour reformer le pont disulfure intramoléculaire. Il apparaît donc préférable de maintenir un nombre de quatre thiols sur le bras de greffage pour assurer une bonne stabilité vis-à-vis de la température.

Exemple 3 : Application à la détection du Virus de l'Hépatite C

Echantillons cibles à tester

1) Cibles naturelles : amplicons « VHC (+) »

Des échantillons de plasmas issus de donneurs de sang, dépistés positifs pour la présence du VHC à l'échelle nationale, sont analysés par séquençage. Le génotype et le sous-type viral du VHC infectant chaque donneur sont déterminés.

Des amplicons « VHC (+) » de 401 pb sont produits à partir de la région virale NS5b du VHC, par RT-PCR à partir de chacun des échantillons de plasmas décrits précédemment. L'ARN est extrait à partir de 200µL de plasma humain en utilisant le kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche) selon les recommandations du fabricant. L'ARN est élué dans 50µL d'eau stérile (DNase/RNase free). Afin d'effectuer l'étape de rétro-transcription (RT), 11µL d'ARN sont dénaturés à 72°C pendant 10 minutes et rétro-transcrits en présence de 4µL de 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 2µL de

10X Hexanucleotide Mix (Roche), 2 μ L de 10mM dNTP mix (Invitrogen) et 200U de SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Les conditions de rétro-transcription sont les suivantes : 10 min à 23°C, 45 min à 37°C, et 10 min à 95°C.

5 Cinq microlitres d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR (réaction en chaîne par polymérase) en utilisant les amorces :

- « VHCsens biotinylée » (de séquence : [Btn]- TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A (soit [Btn]-SEQ ID NO : 8)) et

10 - « VHCanti-sens » (de séquence GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA (SEQ ID NO : 9)) (voir Tamalet C. et al. 2003, *Journal of Medical Virology* 71:391–398).

La réaction d'amplification est effectuée dans 50 μ L de mélange réactionnel comprenant : 1X PCR Buffer sans MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 μ M de chaque amorce, 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2mM dNTP mix (Invitrogen) et 1,3U Taq Polymerase
15 (Invitrogen). Les conditions de PCR sont les suivantes : 5 min à 95°C, 40 cycles (dénaturation: 40 sec, 95°C; hybridation: 40 sec, 56°C; élongation: 50 sec, 72°C), et une extension finale de 10 min à 72°C.

Les amplicons VHC obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose, aliquotés et conservés à -20°C avant utilisation.

20 Ces amplicons, dont les génotypes viraux d'origine sont connus, sont conservés sous la forme d'une thèque.

Un exemple d'amplicon long de 401pb obtenu à partir d'une souche virale 1a/1b, de référence # PTR6719 a pour séquence :

25 5'-
TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACAT
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACCTAGCCCCGAAGCCAGACAG
GCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAA
AAGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGGAGCGGTGTGCTGACGACCA
30 GCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCGGCCTGTGAGCTGC
AAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGT
GAAAGCGCGGGAACCCARGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCT
ATGACCAGGAATTCCGCC - 3' (SEQ ID NO : 12).

35 Un exemple d'amplicon long de 401pb obtenu à partir d'une souche virale 2, de référence # PTR7761 a pour séquence :

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCAACTGTCACTGAGAGAGACAT
 CAGAACCGAGGAGTCCATATACAGGCCTGCTCCCTAACCGAGGAGGCTCGCACC
 GCCATACACTCGCTGACTGAGAGGCTATACGTGGGAGGGGCCCATGCTCAATAGCA
 AAGGCCAGACCTGCGGGTACAGGCGTTGCCGCGCCAGCGGGGTGCTCACCACTA
 5 GCATGGGAAACACCATTACGTGCTATGTGAAAGCTCTAGCGGCATGCAAGGCCGC
 AGGGATAGTAGCGCCACGATGCTGGTATGCGGCGACGACCTGGTCGTCATCTCA
 GAAAGCCAGGGGACTGAGGAGGACGAGCGGAACCTGAGAGTCTTCACGGAGGCT
 ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 31).

10 Un exemple d'amplicon long de 401pb obtenu à partir d'une souche virale 3a, de
 référence # PTR9058 a pour séquence :

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCGACTGTCACTGAACAGGATAT
 CAGGGTGGAAGAGGAGATATACCAATGCTGTAATCTTGAACCGGAGGCCAGGAA
 15 GGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGCTTTACTGCGGGGGTCCTATGTTCAACAGC
 AAAGGGGCCCAGTGTGGTTATCGCCGTTGCCGTGCTAGTGGAGTTCTACCTACCA
 GCTTCGGCAATACAATCACTTGCTACATCAAGGCCACAGCGGCTGCAAGGGCCGC
 AGGCCTCCGGAACCCGGACTTTCTTGTCTGCGGAGACGATCTAGTCGTGGTGGCT
 GAGAGTGACGGCGTCGACGAGGATGGGGCGGCCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCT
 20 ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 14).

Un exemple d'amplicon long de 401pb obtenu à partir d'une souche virale 4a/4d, de
 référence # PTR4162 a pour séquence :

5'-

25 TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACTGTAACCGAAAGAGACAT
 CAGGGTCGAGGAGGAGGTCTATCAGTGTTGTGACCTAGAGCCCGAAGCCCGCAA
 GGTAATATCCGCCCTCACAGAGAGACTCTACGTGGGCGGTCCCATGTACAACAGC
 AGGGGAGACCTTTGCGGAACTCGACGGTGCCGTGCAAGCGGCGTATTCACCACCA
 GCTTTGGGAACACACTGACGTGCTATCTTAAGGCCAGCGCGGCCATCAGGGCTGC
 30 AGGCCTAAAGGACTGCACCATGCTGGTCTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCGCT
 GAAAGCGATGGCGTGGAGGAGGACAACCGTGCGCTCAGAGCCTTCACGGAGGCT
 ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 32).

35 En complément de ces amplicons longs, d'autres amorces ont été dessinées afin
 de générer des amplicons plus courts à partir de chacun des échantillons de plasmas
 décrits précédemment. Le même protocole global est suivi pour générer les amplicons

« courts », et seules les amorces utilisées sont changées. Les amorces utilisées sont choisies selon le génotype et/ou le sous-type du VHC ayant infecté les patients.

Des amplicons spécifiques des VHC de sous-type 1a/1b, d'une taille de 191

5 nucléotides sont amplifiés avec les amorces suivantes :

- Amorce sens biotinylée « 1a/1b sens », de séquence 5'-[Btn]-TGA-CRA-CYA-GCT-GYG-GTA-AYA-CCC-T- 3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 10), et
- Amorce antisens « VHCantisens » de SEQ ID NO : 9 (voir plus haut).

10 Un exemple d'amplicon court de 191 nucléotides obtenu à partir d'une souche virale 1a/1b, de référence # PTR6719 a pour séquence :

5'-

TGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCGGCCTG
TCGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTC
15 GTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCARGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCA
CGGAGGCTATGACCAGGAATTCCGCC -3' (SEQ ID NO : 13).

Des amplicons spécifiques des VHC de sous-type 2, d'une taille de 108 nucléotides sont amplifiés avec les amorces suivantes :

- 20
- Amorce sens biotinylée « VHC 2 sens biotinylée », de séquence 5'-[Btn]-ATG-YTG-GTR-TGC-GGC-GAC-GAC- 3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 29), et
 - Amorce antisens « VHCantisens » de SEQ ID NO : 9 (voir plus haut).

25 Un exemple d'amplicon court de 108 nucléotides obtenu à partir d'une souche virale 2, de référence # PTR7761 a pour séquence :

5'-

ATGCTGGTATGCGGCGACGACCTGGTCGTCATCTCAGAAAGCCAGGGGACTGAG
GAGGACGAGCGGAACCTGAGAGTCTTCACGGAGGCTATGACCAGGAATTCCGCC
-3' (SEQ ID NO : 33).

30

Des amplicons spécifiques des VHC de sous-type 3a, d'une taille de 143 nucléotides sont amplifiés avec les amorces suivantes :

- Amorce sens biotinylée « VHC sens », de SEQ ID NO : 8 (voir plus haut), et
- Amorce antisens « 3a rev » de séquence : 5'-GCA-GTA-AAG-CCG-YTC-CGT-GAG-3' (SEQ ID NO : 11).

35

Un exemple d'amplicon court de 143 nucléotides obtenu à partir d'une souche virale 3a, de référence # PTR9058 a pour séquence :

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCGACTGTCACTGAACAGGATAT
 5 CAGGGTGAAGAGGAGATATACCAATGCTGTAATCTTGAACCGGAGGCCAGGAA
 GGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGCTTTACTGC-3' (SEQ ID NO :15).

Des amplicons spécifiques des VHC de sous-type 4a/4d, d'une taille de 175 nucléotides sont amplifiés avec les amorces suivantes :

- 10 - Amorce sens biotinylée « VHC sens », de SEQ ID NO : 8 (voir plus haut), et
 - Amorce antisens « VHC anti-sens 4 rev » de séquence : 5'-AGG-TCT-CCC-YTG-CTG-TTG-TRC-AT-3' (SEQ ID NO : 30).

Un exemple d'amplicon court de 175 nucléotides obtenu à partir d'une souche virale 4a/4d, de référence # PTR4162 a pour séquence :

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACTGTAACCGAAAGAGACAT
 CAGGGTCGAGGAGGAGGTCTATCAGTGTTGTGACCTAGAGCCCGAAGCCCGCAA
 GGTAATATCCGCCCTCACAGAGAGACTCTACGTGGGCGGTCCCATGTACAACAGC
 20 AGGGGAGACCT -3' (SEQ ID NO : 34).

Comme précédemment, les amplicons VHC « courts » obtenus de 191, 108, 175 et 143 nucléotides sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose, aliquotés et conservés à -20°C avant utilisation.

- 25 Ces amplicons, dont les génotypes viraux d'origine sont connus, sont conservés sous la forme d'une thèque.

2) Cibles synthétiques : oligonucléotides biotinylés 15-mères ou 105-mères

- 30 Des oligonucléotides synthétiques 15-mères ou 105-mères biotinylés à l'extrémité 5' ont été synthétisés.

Les oligonucléotides synthétiques 15-mères sont strictement complémentaires aux sondes VHC choisies (voir ci-après), et possèdent les séquences suivantes :

- 35 - les oligonucléotides synthétiques 15-mères spécifiques du sous-type 1a/1b ont la séquence : 5' [Btn]- GCT CCR GGA ACT GCA C -3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 2) ;

- les oligonucléotides synthétiques 15-mères spécifiques du sous-type 3a ont la séquence : [Btn]-CTT GAA CCG GAG GCC-3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 5) et
- les oligonucléotides synthétiques 15-mères spécifiques du sous-type 4a/4d ont la séquence : 5' [Btn]-CTA YGT GGG CGG YCC -3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 39).

5

Des oligonucléotides plus longs comprenant la séquence complémentaire des sondes VHC présentées ci-après, encadrées de part et d'autre par des séquences de 45 nucléotides, soit 105 nucléotides au total, et biotinylés à l'extrémité 5' ont également été synthétisés pour le développement des tests d'hybridation sondes/cibles.

10

Les oligonucléotides synthétiques 105-mères utilisés possèdent les séquences suivantes :

- les oligonucléotides synthétiques 105-mères spécifiques du sous-type 1a/1b ont la séquence : 5' [Btn]- CCT CAC TTG CTA CAT CAA GGC CCA GGC AGC CTG
15 TCG AGC CGC AGG - GCT CCR GGA ACT GCA C - CAT GCT CGT GTG TGG
CGA CGA CTT AGT CGT TAT CTG TGA AAG TGC-3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 3) ; et
- les oligonucléotides synthétiques 105-mères spécifiques du sous-type 3a ont la séquence : 5' [Btn]- GAA CAG GAC ATC AGG GTG GAA GAG GAG ATA TAC
20 CAA TGC TGT AAC - CTT GAA CCG GAG GCC – AGG AAA GTG ATC TCC
TCC CTC ACG GAG CGG CTT TAC TGC GGG GGC -3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 6).

25

Design des sondes oligonucléotidiques pour la reconnaissance de séquences VHC.

La région NS5b codant l'ARN polymérase du VHC a été ciblée pour le design des sondes oligonucléotidiques de l'invention.

- Les séquences de génomes VHC amplifiés dans la région NS5b (banque représentative de 800 échantillons) ont été déterminées et analysées à l'aide des
30 logiciels d'alignement clustalW2 et de phylogénie Mega5 afin d'identifier les zones
les plus conservées pour chaque génotype et/ou sous-type du VHC. Des régions
distinctes permettant la reconnaissance générique des séquences virales d'un génotype
et éventuellement d'un sous-type donné ont été sélectionnées. Une région très
conservée permettant la détection spécifique de tous les VHC de génotype viral 1a/1b
35 a ainsi été identifiée et sélectionnée. De la même manière, une région permettant la
détection spécifique des VHC de génotype viral 2, 2a/2c, 2b, 3a et 4a/4d a été
identifiée et sélectionnée. Des oligonucléotidiques 15-mères complémentaires de

chacune des régions choisies ont été dessinés et des oligonucléotides multi-thiols ont ensuite été synthétisés sur la base des séquences choisies pour la reconnaissance spécifique des sous-types 1a/1b, 2, 2a/2c, 2b, 3a et 4a/4d.

5 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 1a/1b est : 5'-GTG-CAG-TCC-YGG-AGC (SEQ ID NO : 1). Cette sonde est spécifique des souches de sous-type 1a et 1b.

10 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 2 est : 5'-TGG-CTY-TCT-GAG-ATG (SEQ ID NO : 27). Cette sonde est spécifique des souches de sous-type 2.

15 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 2a/2c est : 5'-GGA-CTC-CTC-RGT-TCT (SEQ ID NO : 35). Cette sonde est spécifique des souches de sous-type 2a et 2c.

20 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 2b est : 5'-TAT-GGA-TTC-TTC-TGT (SEQ ID NO : 36). Cette sonde est spécifique des souches de sous-type 2b.

25 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 3a est : 5'-GGC-CTC-CGG-TTC-AAG (SEQ ID NO : 4). Cette sonde est spécifique des souches de sous-type 3a.

 La séquence oligonucléotidique retenue pour générer la sonde 4a/4d est : 5'-GGR-CCG-CCC-ACR-TAG (SEQ ID NO : 28). Cette sonde est spécifique des souches de sous-types 4a et 4d.

30 *Evaluation des hybridations sondes / cibles par ELOSA (Enzyme-Linked OligoSorbent Assay)*

35 Le greffage de tout type de sondes thiol (oligonucléotides d'anométrie alpha ou bêta, sondes linéaires ou tige-boucle (« snails ») ...) peut être réalisé selon le protocole optimisé suivant. Les puits de microplaques activées maléimide (Pierce) sont lavés par le tampon WB1 (0,1M Na₂HPO₄, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20 (w/v), pH 7,2). La fonctionnalisation des puits est réalisée avec 100nM de sondes multi-thiol

(telles que décrites ci-dessus) dans du tampon BB (0,1M Na₂HPO₄, 0,15M NaCl, 10mM EDTA, pH 7,2) pendant 2 heures à température ambiante (TA). Les puits sont ensuite lavés trois fois avec WB1, saturés par une solution de Cystéine-HCl 10 µg.mL⁻¹ dans BB (Pierce) pendant 1 heure à TA, et lavés à nouveau trois fois avec WB1.

5

Les tests d'hybridation sont réalisés avec des cibles synthétiques courtes 15-mères ou 105-mères ou avec de réels amplicons VHC longs (401 nt) ou plus courts (191 nt ou 143 nt). Les cibles synthétiques et les amplicons sont dilués dans 150 µL de tampon d'hybridation (TH : 0,9M NaCl, 60mM NaH₂PO₄, 6mM EDTA, pH 7,4, Denhardt 5X) avant d'être déposés dans les puits. Une étape supplémentaire de dénaturation de 10 min à 95°C est effectuée sur les amplicons avant transfert dans les micropuits. L'hybridation est réalisée sur la nuit à 37°C. Les puits sont lavés avec du tampon WB2 (0,75M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 7,4, SDS 0,1 %) trois fois 2 min à TA et une fois 30 min à 50°C.

15

L'étape de détection est réalisée après incubation pendant 30 min à TA des puits en présence de 100 µL/puits de Streptavidine-Europium (Perkin Elmer) diluée dans 100 µL de tampon de test (« Assay Buffer », Perkin Elmer). Les puits sont finalement lavés six fois avec du tampon WB3 (WB1X, Perkin Elmer) et 200 µL de tampon de révélation du signal (« Enhancement Buffer », Perkin Elmer) sont ajoutés dans chaque puits pendant 5 min à TA. La fluorescence en temps résolu est mesurée sur un détecteur multi-marquage Victor₃TM 1420 (« multilabel counter », Perkin Elmer) selon le protocole du fabricant (excitation à 340 nm et émission à 615 nm).

20

25 Résultats 1 : Tests d'hybridation sur sondes linéaires d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol

30

Des sondes 3a linéaires d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol sont greffées, à une densité de 100nM, sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus. Les résultats obtenus avec les sondes 3a sont décrits dans les figures 8, et 9.

35

Des tests ELOSA sont réalisés en faisant varier la nature et la concentration de la cible utilisée (cibles synthétiques courtes 15-mères et 105-mères, amplicons courts de 143 nt ou 191 nt, amplicons longs de 401 nt), afin de vérifier la spécificité des sondes retenues.

- Les résultats présentés dans la figure 8 correspondent à un test ELOSA réalisé avec des amplicons longs spécifiques du génotype VHC 3a, aux dilutions 1/10, 1/100 et 1/1000 et avec des amplicons longs non spécifiques (correspondant au génotype VHC 1a/1b) aux dilutions 1/10, 1/100 et 1/1000. Le contrôle positif d'hybridation est effectué avec une cible synthétique (15-mère) spécifique du génotype 3a à des concentrations de 1000pM et 5pM. Les contrôles négatifs d'hybridation sont effectués avec une cible synthétique (15-mère) non spécifique (correspondant à la séquence cible 1a/1b) à une concentration de 1000pM, ou avec du TH (tampon d'hybridation) seul, ne comprenant pas de cible.
- Pour que la sonde 3a puisse être considérée comme « spécifique » du sous-type 3a, il s'avère donc nécessaire que les résultats obtenus avec des cibles « 3a » dépassent le bruit de fond obtenu avec les contrôles négatifs, de sorte que l'hybridation sonde/cible puisse être quantifiée.
- Les résultats présentés dans la figure 9 correspondent à un test ELOSA réalisé avec les cibles suivantes :
- cible synthétique 15-mère ou 105-mère spécifique 3a, à une concentration de 10pM, 100pM ou de 1000pM,
 - cible synthétique 15-mère ou 105-mère non spécifique 1a/1b (contrôle négatif), à une concentration de 10pM, 100pM ou de 1000pM,
 - amplicon long spécifique 3a, à la dilution 1/100,
 - amplicon long non spécifique 1a/1b, à la dilution 1/100,
 - amplicon court spécifique 3a (143 nt), aux dilutions 1/100 et 1/1000,
 - amplicon court non spécifique 1a/1b (191 nt), aux dilutions 1/100 et 1/1000,
 - TH seul, ne comprenant pas de cible.

Les résultats obtenus dans les figures 8, et 9 montrent que la sonde « 3a » selon la présente invention est non seulement capable de s'hybrider avec des cibles synthétiques spécifiques 3a 15-mères (la cible ayant une concentration de 5pM) ou 105-mères (la cible ayant une concentration de 10pM), mais aussi avec des amplicons longs de 401 nt ou courts de 143 nt obtenus à partir de plasmas génotypés 3a, et donc spécifiques du génotype 3a (à une dilution au 1/1000^{ème}). Ces résultats montrent également que les cibles 1a/1b, non spécifiques de la sonde 3a, ne s'hybrident pas de manière détectable avec cette dernière, indépendamment de leur forme (cible synthétique 15-mère ou 105-mère, amplicon court 191 nt ou long 401 nt), ou de leur concentration (1000pM pour les cibles synthétiques ou dilution au 1/10^{ème} pour les amplicons).

Les résultats présentés dans la figure 10 correspondent à un test ELOSA réalisé avec des sondes 1a/1b linéaires (voir plus haut), d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol, qui sont greffées à une densité de 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus.

Les résultats de la figure 10 sont obtenus à partir des cibles suivantes :

- cible synthétique 15-mère ou 105-mère spécifique 1a/1b, à une concentration de 10pM, 100pM ou 1000pM,
- 10 - cible synthétique 15-mère ou 105-mère non spécifique 3a (contrôle négatif), à une concentration de 10pM, 100pM ou 1000pM,
- amplicon long spécifique du génotype VHC 1a/1b, à la dilution 1/100,
- amplicon long non spécifique 3a, à la dilution 1/100,
- amplicon court (191 nt) spécifique 1a/1b, aux dilutions 1/100 et 1/1000,
- 15 - amplicon court (143 nt) non spécifique 3a, aux dilutions 1/100 et 1/1000,
- TH seul, ne comprenant pas de cible.

Les résultats obtenus dans la figure 10 montrent que la sonde 1a/1b selon la présente invention est non seulement capable de s'hybrider avec des cibles synthétiques 15-mères ou 105-mères spécifiques 1a/1b (la cible ayant une concentration de 10pM), mais aussi avec des amplicons courts de 191 nt obtenus à partir de plasmas génotypés 1a/1b, et donc spécifiques du génotype 1a/1b (à une dilution au 1/1000^{ème}), et avec des amplicons longs de 401 nt spécifiques du génotype 1a/1b (à une dilution au 1/100^{ème}). Ces résultats montrent également que les cibles 3a, non spécifiques de la sonde 1a/1b, ne s'hybrident pas de manière détectable avec cette dernière, indépendamment de leur forme (cible synthétique 15-mère ou 105-mère, amplicon court 143 nt ou long 401 nt), ou de leur concentration (1000pM pour les cibles synthétiques ou dilution au 1/10^{ème} pour les amplicons).

30 Les résultats présentés dans la figure 17 correspondent à un test ELOSA réalisé avec une sonde 1a/1b linéaire d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol, qui est greffée à une densité de 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus.

35 Les résultats de la figure 17 sont obtenus à partir des cibles suivantes :

- cible synthétique 15-mère spécifique 1a/1b à une concentration de 10pM ou 1000pM,

- cible synthétique 15-mère non spécifique 2a/2c, 2b, 3a ou 4a/4d (contrôle négatif), à une concentration de 10pM ou 1000pM,
- amplicon long spécifique du génotype VHC 1a/1b, à la dilution 1/100,
- amplicon long non spécifique 2a/2b/2c, 3a ou 4a/4d à la dilution 1/100,
- 5 - TH seul, ne comprenant pas de cible.

Les résultats présentés dans la figure 18 correspondent à un test ELOSA réalisé avec un mélange de deux sondes (2a/2c de SEQ ID NO : 35 et 2b de SEQ ID NO : 36) linéaires d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol, qui sont greffées à une densité
10 de 50nM chacune sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus.

- Les résultats de la figure 18 sont obtenus à partir des cibles suivantes :
- cibles synthétiques 15-mères spécifiques 2a/2c et 2b à une concentration de 10pM ou
15 1000pM,
 - cible synthétique 15-mère non spécifique 1a/1b, 3a ou 4a/4d (contrôle négatif), à une concentration de 10pM ou 1000pM,
 - amplicon long spécifique du génotype VHC 2a/2b/2c, à la dilution 1/100,
 - amplicon long non spécifique 1a/1b, 3a ou 4a/4d à la dilution 1/100,
 - 20 - TH seul, ne comprenant pas de cible.

Les résultats présentés dans la figure 19 correspondent à un test ELOSA réalisé avec une sonde 3a linéaire d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol, qui est greffée à une densité de 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le
25 protocole décrit ci-dessus.

- Les résultats de la figure 19 sont obtenus à partir des cibles suivantes :
- cible synthétique 15-mère spécifique 3a à une concentration de 10pM ou 1000pM,
 - cible synthétique 15-mère non spécifique 1a/1b, 2a/2b/2c ou 4a/4d (contrôle négatif),
30 à une concentration de 10pM ou 1000pM,
 - amplicon long spécifique du génotype VHC 3a, à la dilution 1/100,
 - amplicon long non spécifique 1a/1b, 2a/2b/2c ou 4a/4d à la dilution 1/100,
 - TH seul, ne comprenant pas de cible.

35 Les résultats présentés dans la figure 20 correspondent à un test ELOSA réalisé avec une sonde 4a/4d linéaire d'anométrie bêta possédant 4 fonctions thiol, qui est greffée à

une densité de 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus.

Les résultats de la figure 20 sont obtenus à partir des cibles suivantes :

- 5 - cible synthétique 15-mère spécifique 4a/4d à une concentration de 10pM ou 1000pM,
- cible synthétique 15-mère non spécifique 1a/1b, 2a/2b/2c ou 3a (contrôle négatif), à une concentration de 10pM ou 1000pM,
- amplicon long spécifique du génotype VHC 4a/4d, à la dilution 1/100,
- 10 - amplicon long non spécifique 1a/1b, 2a/2b/2c ou 3a à la dilution 1/100,
- TH (tampon d'hybridation) seul, ne comprenant pas de cible.

Pour les tests effectués en utilisant des amplicons, les résultats de 3 essais indépendants réalisés à partir de souches virales d'origines différentes, mais du même sous-type, sont présentés dans les figures 17 à 20.

Les résultats obtenus dans les figures 17 à 20 montrent que chacune des sondes 1a/1b, 2a//2c, 2b, 3a ou 4a/4d selon la présente invention est non seulement capable de s'hybrider avec des cibles synthétiques 15-mères qui lui sont spécifiques (la cible ayant une concentration de 10pM), mais aussi avec des amplicons spécifiques du même génotype (à une dilution au 1/100^{ème}). Ces résultats montrent également que les cibles non spécifiques ne s'hybrident pas de manière détectable.

Résultats 2 : Etude de l'effet du nombre de fonctions thiol

Des tests ELOSA sont également réalisés en faisant varier le nombre de fonctions thiol dans la sonde utilisée et en testant différentes natures et concentrations de cibles (cible synthétique courte 15-mère ou 105-mère, amplicons courts de 143 nt ou 191 nt, amplicons longs de 401 nt).

Les résultats présentés dans la figure 11 correspondent à un test ELOSA réalisé avec des sondes 1a/1b linéaires (voir plus haut), d'anométrie bêta possédant 1, 2, 4, 6 ou 8 fonctions thiol, qui sont greffées à une densité de 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus. Les résultats de la figure 11 sont obtenus à partir des cibles suivantes :

- cible synthétique 15-mère ou de 105-mère spécifique 1a/1b, à une concentration de 10pM, 100pM ou 1000pM,

- cible synthétique 15-mère ou 105-mère non spécifique 3a (contrôle négatif), à une concentration de 10pM, 100pM ou 1000pM,
- TH seul, ne comprenant pas de cible.

- 5 Chaque condition d'hybridation sonde/cible est testée en triplicat dans une microplaque. Les essais sont reproduits trois fois intégralement de l'étape de greffage des sondes à la détection de l'hybridation (sur 3 microplaques différentes). Les résultats exposés dans la demande correspondent donc à une moyenne de 9 mesures.
- 10 Les résultats obtenus dans la figure 11 montrent que l'hybridation d'une cible synthétique 15-mère spécifique 1a/1b avec la sonde 1a/1b est détectable à partir de 10pM de cible, dès la présence d'un thiol. La détection de la cible synthétique 105-mère spécifique 1a/1b nécessite, quant à elle, une concentration en cible de 100pM lorsque la sonde comprend 2 fonctions thiol ou de 10pM lorsque la sonde comprend 4,
- 15 6 ou 8 fonctions thiol. Aucune hybridation détectable n'est observée en présence des cibles 3a, non spécifiques de la sonde 1a/1b, indépendamment de leur taille (15-mères ou 105-mères) ou de leur concentration (concentration maximale testée : 1000pM). Les résultats montrent ainsi que l'ajout de fonctions thiol dans la sonde oligonucléotidique greffée améliore les performances de détection des cibles visées.
- 20 La présence de 4 fonctions thiol dans la sonde utilisée permet de détecter toutes les cibles synthétiques (15-mères ou 105-mères) à une concentration de 10pM.

Résultats 3 : Etude de l'effet de la densité de greffage

- 25 Les résultats présentés dans les figures 12, 13 et 14 correspondent à des tests ELOSA réalisés avec des sondes 1a/1b linéaires (voir plus haut), d'anométrie bêta possédant 1, 2 ou 4 fonctions thiol, qui sont greffées à des densités de 1, 10, 25, 50 ou 100nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit ci-dessus. La figure 12 illustre les résultats obtenus pour la sonde monothiol, c'est-à-dire
- 30 comprenant un seul composé thiol selon l'invention. La figure 13 illustre les résultats obtenus pour la sonde dithiol, c'est-à-dire comprenant deux composés thiol selon l'invention, et la figure 14 illustre les résultats obtenus pour la sonde tétrathiol, c'est-à-dire comprenant quatre composés thiol selon l'invention.
- 35 Dans chaque cas, les tests d'hybridation sont réalisés avec les cibles suivantes :
- cible synthétique 15-mère ou 105-mère spécifique 1a/1b, à une concentration de 1000pM, de 100pM ou 10pM,

- cible synthétique 15-mère ou 105-mère non spécifique 3a (contrôle négatif), à une concentration de 1000pM, de 100pM ou 10pM,
- TH seul, ne comprenant pas de cible.

5 Les résultats présentés dans les figures 12, 13 et 14 confirment la spécificité d'hybridation des sondes 1a/1b avec les cibles 1a/1b, dans la mesure où il n'est pas observé d'hybridation détectable en présence des cibles 3a, indépendamment de la concentration de ces dernières.

10 Ces résultats confirment (1) que la présence d'un seul thiol dans la sonde utilisée ne permet pas de détecter les cibles ayant une taille de 105 nt, (2) qu'à partir de 2 fonctions thiol, il devient possible de détecter l'hybridation entre la sonde et la cible de 105 nt (en particulier à partir de 100pM de cible), (3) que les meilleurs résultats sont obtenus avec la sonde tétrathiol.

15 D'autre part, il apparaît que la densité de greffage de la sonde monothiol n'influe pas beaucoup sur les signaux d'hybridation quelles que soient les cibles (15-mères et 105-mères), tandis que l'hybridation est dose-dépendante de la densité de greffage dans le cas des sondes dithiol et tétrathiol. Les meilleurs signaux d'hybridation sondes/cibles (15-mères et 105-mères) sont obtenus avec la sonde tétrathiol greffée à 100nM.

20 *Evaluation des hybridations sondes/cibles sur électrode à surface d'or*

Un test d'hybridation a été réalisé en greffant une séquence sonde spécifique 1a/1b sur une électrode à surface d'or.

25 Une sonde tétrathiol portant un oligonucléotide de séquence SEQ ID NO :1 a été greffée sur l'électrode de travail à surface d'or d'une cellule. L'hybridation de cibles 105-mères spécifiques 1a/1b (de SEQ ID NO : 3) a été évaluée, pour 3 concentrations différentes de cibles : 1pM, 10pM et 100pM. Un contrôle négatif est effectué avec une cible 105-mères spécifique 3a de SEQ ID NO : 6 (témoin négatif).

30 La réaction d'hybridation est suivie par voltamétrie à pulses différentiels. Les résultats obtenus sont présentés en figure 15.

Les valeurs en ordonnée correspondent aux valeurs normalisées de variation de courant.

35 Les résultats obtenus montrent que le test d'hybridation par électrochimie est sensible et spécifique à une concentration de cibles de 1pM. La variation de signal apparaît également être plus forte à 1pM que lorsque le test est mené à 100pM. A plus forte concentration en cible, un effet d'adsorption non spécifique des cibles sur la surface de l'électrode réduit l'efficacité de la réaction de reconnaissance. La méthode

électrochimique ne permet pas un suivi quantitatif de la réaction d'hybridation. Néanmoins, elle fournit une réponse oui/non spécifique d'une très grande sensibilité.

5 Exemple 4 : Application à la détection de flavivirus, tels que les virus de la Dengue et du West Nile

Des séquences connues des virus de la Dengue (sérotypes 1, 2, 3 et 4) et du West Nile ont été extraites de la base de données GenBank et analysées. Le tableau 1 recense les numéros d'accèsion GenBank des séquences de virus de la Dengue et du West Nile
10 ayant servi à réaliser les alignements :

Tableau 1

Virus	Numéro d'accèsion GenBank des séquences
Dengue 1 (8 souches)	FJ882517, FJ882552, EU482480, FJ639683, HM181967, AY726549, GU131762, GU131982
Dengue 2 (17 souches)	GQ398257, HM582109, HM582110, HM582116, HM582117, AY744150, AY744149, AY744148, AY744147, EU056812, AF169686, AF169683, AF169687, AF169682, GU131896, DQ181803, EU073981
Dengue 3 (34 souches)	GQ252678, GU131951, EU482566, GQ868574, GQ868617, FJ882577, GU131868, FJ024465, HM181974, HM181973, GQ199870, AY770511, GU370053, GQ199888, GU131939, GU131937, GU131934, HM631854, GU131905, GU189648, EU660409, DQ109373, DQ109368, DQ109310, AY676351, AY676350, FJ744740, FJ744730, DQ109400, DQ109348, GQ868593, AB214880, AY744677, EF629370
Dengue 4 (20 souches)	AY618992, AY618990, AY858049, AY618993, GQ398256, AF289029,

	EU854301, AF326573, GQ199884, GQ868584, AY618988,	EU073983, FJ882597, GQ199882, AY762085, EF457906	GU289913, GQ199885, GQ868582, AY618989,
West Nile (15 souches)	GQ851607, AY490240, GQ851603, EF429199, AY277251,	GQ851606, AY274504, DQ256376, EF429200, FJ159131,	AY369441, GQ851602, DQ318019, JN858070, FJ159129

Design des sondes oligonucléotidiques pour la reconnaissance de séquences Dengue ou West Nile.

5 Les alignements et les comparaisons de séquences effectués à l'aide des logiciels clustalW2 et Mega5 ont permis de définir 4 régions, parmi lesquelles :

- 2 sont conservées parmi toutes les souches des virus Dengue et West Nile, ainsi que parmi d'autres flavivirus tels que les virus de l'encéphalite japonaise, de l'encéphalite à tique, de la fièvre jaune et le virus usutu (liste non-exhaustive),

10 - 1 est conservée parmi les virus de la Dengue,

- 1 est conservée parmi les virus West Nile.

15 Ces régions ont été utilisées pour dessiner des sondes selon la présente invention, dans le but de permettre la détection générique des flavivirus, ou la détection spécifique des virus de la Dengue, du sous-type 4 de la Dengue ou du virus de West Nile, dans un échantillon biologique.

20 Les sondes 1 à 3 présentées dans le tableau 2 ci-après permettent ainsi de détecter les flavivirus de manière générale (incluant les flavivirus de la Dengue et du West Nile). La sonde 4 est spécifique des virus de la Dengue, quelque soit le sérotype. La sonde 5 est spécifique du sérotype 4 des virus de la Dengue. La sonde 6 est spécifique des virus West Nile.

Tableau 2

Sonde	Séquence	Spécificité	Taille	SEQ ID
Sonde 1	5'-GCT CCC ARC CAC AT-3'	Générique	14-mère	SEQ ID NO: 16
Sonde 2	5'-AAC CAT CTR TCT TC-3'	Générique	14-mère	SEQ ID NO: 17
Sonde 3	5'-AGC CAC ATG WAC CA -3'	Générique	14-mère	SEQ ID NO: 40
Sonde 4	5'-CTT CYC CTT CYA CTC-3'	Dengue	15-mère	SEQ ID NO: 18

Sonde 5	5'-CAC TCC ACT CCA TGA-3'	Dengue 4	15-mère	SEQ ID NO: 41
Sonde 6	5'-CKC CTC CTG ART TCT-3'	West Nile Virus	15-mère	SEQ ID NO: 19

Design de cibles pour tester la spécificité de reconnaissance des sondes 1 à 6

- 5 Des amplicons englobant chacune des 6 régions identifiées sont préparés en effectuant une PCR simple, à partir des séquences mentionnées dans le tableau 1, en utilisant les amorces et le protocole précédemment décrits par Scaramozzino et al. (Scaramozzino N. et al. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and developement of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of
10 flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. 2001. Journal of Clinical Microbiology 39: 1922-1927).

L'amplification primaire par PCR est ainsi réalisée avec :

- l'amorce sens MAMD: [Btn]-5'-AAC-ATG-ATG-GGR-AAR-AGR-GAR-AA-3'
15 (soit [Btn]- SEQ ID NO : 20), et
- l'amorce antisens cFD2 (SEQ ID NO : 21) : 5'-GTG-TCC-CAG-CCG-GCG-GTG-TCA-TCA-GC -3'.

Cette amplification conduit à l'obtention d'un amplicon primaire de 263 pb.

- 20 Lorsque la charge virale est très faible, une PCR secondaire est effectuée en utilisant comme matrice les produits d'amplification résultant de la première PCR. Cette PCR « semi-nichée » permet avantageusement un gain significatif de sensibilité.

- Un exemple d'amplicon de 263 pb obtenu après amplification à partir de la souche de
25 virus de Dengue référencée sous le numéro FJ882517 a pour séquence : 5'-AACATGATGGGGAAGAGAGAGAAAACTAGGAGAGTTCGGAAAGGCAA
AAGGAAGTCGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTAGAG
TTCGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGAA
TTCACTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAACTTGGATATATAC
30 TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAACATGTATGCAGATGACACA
GCCGGATGGGACAC-3' (SEQ ID NO :23).

- Un exemple d'amplicon de 263 pb obtenu après amplification à partir de la souche de
35 virus West Nile référencée sous le numéro EF429200/H442 a pour séquence : 5'-AACATGATGGGAAAGAGAGAGAAGAAGCCTGGAGAGTTCGGCAAGGCTA
AAGGCAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTGGGGGCTCGTTTCCTGGAG
TTTGAAGCTCTCGGATTCCTCAATGAAGACCACTGGCTGGGTAGGAAGAA

CTCAGGAGGAGGAGTTGAAGGCTTAGGACTGCAGAAGCTTGGGTACATCT
TGAAGGAAGTTGGGACAAAGCCTGGAGGAAAGATTTACGCCGATGATACC
GCAGGCTGGGACAC-3' (SEQ ID NO :25).

- 5 Une amplification secondaire par PCR peut éventuellement être ensuite réalisée conformément au protocole publié par Scaramozzino et al., en utilisant les amplicons primaires ci-dessus comme matrice avec :
- l'amorce sens FS778 : [Btn] 5'- AAR-GGH-AGY-MCD-GCH-ATH-TGG-T- 3' (soit [Btn]- SEQ ID NO: 22), et
 - 10 - l'amorce antisens cFD2 (SEQ ID NO : 21) : 5'-GTG-TCC-CAG-CCG-GCG-GTG-TCA-TCA-GC -3'.

Cette amplification conduit à l'obtention d'un amplicon secondaire de 215 pb.

- Un exemple d'amplicon de 215 pb obtenu après amplification à partir de la souche de
- 15 virus de Dengue référencée sous le numéro FJ882517 a pour séquence : 5'-
AAAGGAAGTCGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTAGA
GTTCTGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGA
ATTCCTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAACTTGGATATATA
CTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACAC
20 AGCCGGATGGGACAC-3' (SEQ ID NO : 24).

- Un exemple d'amplicon de 215 pb obtenu après amplification à partir de la souche de
- virus West Nile référencée sous le numéro EF429200/H442 a pour séquence : 5'-
- 25 AAAGGCAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTGGGGGCTCGTTTCCTGGA
GTTTGAAGCTCTCGGATTCCTCAATGAAGACCACTGGCTGGGTAGGAAGA
ACTCAGGAGGAGGAGTTGAAGGCTTAGGACTGCAGAAGCTTGGGTACATC
TTGAAGGAAGTTGGGACAAAGCCTGGAGGAAAGATTTACGCCGATGATAC
CGCAGGCTGGGACAC-3' (SEQ ID NO :26).

- 30 Dans un autre mode de réalisation, les amplicons sont préparés à partir d'ARN viraux de flavivirus, de Dengue ou de virus West Nile par RT-PCR asymétrique. Des ARNs viraux sont extraits à partir de virus Dengue (1-4) et West Nile (d'origine américaine NY ou africaine Af) produits *in vitro*. Des amplicons de 263 pb sont produits à partir de la région virale NS5 des flavivirus, par RT-PCR à partir de chacun des échantillons
- 35 d'ARN décrits précédemment. Afin d'effectuer l'étape de rétro-transcription (RT), 5µL d'ARN sont dénaturés à 72°C pendant 10 minutes et rétro-transcrits en présence de 4µL de 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 2µL de 10X Hexanucleotide Mix

(Roche), 2µL de 10mM dNTP mix (Invitrogen) et 200U de SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) dans un volume total de 20µL. Les conditions de rétro-transcription sont les suivantes : 10 min à 25°C, 60 min à 42°C, et 10 min à 95°C. Cinq microlitres d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR (réaction en chaîne par polymérase) en utilisant les amorces :

- sens flavivirus « MAMD » biotinylée (de séquence : [Btn]- AAC ATG ATG GGR AAR AGR GAR AA (soit [Btn]-SEQ ID NO : 20)) et

- anti-sens flavivirus « cFD2 » (de séquence GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC (SEQ ID NO : 21)) (voir Scaramozzino N. et al. 2001, Journal of Clinical Microbiology 39:1922–1927).

La réaction d'amplification asymétrique est effectuée dans 50µL de mélange réactionnel comprenant : 1X PCR Buffer sans MgCl₂ (Invitrogen), 0,2µM de MAMD, 0,02µM de cFD2, 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2mM dNTP mix (Invitrogen) et 1,5U Taq Polymerase (Invitrogen). Les conditions de PCR sont les suivantes : 5 min à 95°C, 40 cycles (dénaturation: 40 sec, 94°C; hybridation: 40 sec, 53°C; élongation: 50 sec, 72°C), et une extension finale de 10 min à 72°C. Les amplicons obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose, aliquotés et conservés à -20°C avant utilisation. Ces amplicons, dont les génotypes viraux d'origine sont connus, sont conservés sous la forme d'une thèque.

Des oligonucléotides synthétiques 15-mères biotinylés à l'extrémité 5' ont été synthétisés. Ces oligonucléotides sont strictement complémentaires aux sondes choisies ci-dessus, c'est-à-dire à la sonde 3 générique pour détecter les flavivirus, à la sonde générique pour détecter le virus West Nile et à la sonde spécifique du sérotype 4 du virus de la Dengue. Ces oligonucléotides synthétiques possèdent les séquences suivantes :

- Les oligonucléotides synthétiques 14-mères spécifiques des flavivirus ont la séquence : 5' [Btn]- TGG TWC ATG TGG CT-3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 43) ;

- Les oligonucléotides synthétiques 15-mères spécifiques du virus West Nile ont la séquence : 5' [Btn]- AGA AYT CAG GAG GMG -3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 42) et

- Les oligonucléotides synthétiques 15-mères spécifiques du sérotype 4 du virus de la Dengue ont la séquence : 5' [Btn]- TCA TGG AGT GGA GTG -3' (soit [Btn]-SEQ ID NO : 44).

Des tests d'hybridations sont effectués avec la sonde 3 reconnaissant de manière générique les flavivirus (voir figure 21), la sonde 5 reconnaissant spécifiquement le sérotype 4 de la Dengue (voir figure 22) et la sonde 6 reconnaissant le virus West Nile (voir figure 23). Les sondes, possédant 4 fonctions thiol sont greffées à une densité de 200nM sur un support couvert de groupements maléimide selon le protocole décrit plus haut. Des tests ELOSA sont ensuite réalisés en utilisant des amplicons préparés à partir de sérotypes 1, 2, 3 ou 4 de la Dengue, de virus West Nile d'origine américaine (NY) ou Africaine (Af), ou de virus de l'hépatite C (amplicon long 3a), à une dilution de 1/10 pour la sonde 3 et de 1/50 pour les sondes 5 et 6 afin de vérifier la spécificité des sondes retenues. Dans les graphiques des figures 21, 22 et 23, la valeur « échantillons/bruit de fond » est obtenu en calculant le ratio entre le nombre de coups mesuré pour chaque échantillon et le nombre de coups mesuré pour le témoin (TH), correspondant au tampon d'hybridation seul, ne comprenant pas de cible. Les amplicons de Dengue et de virus West Nile utilisés dans ces tests ont été obtenus par la méthode de RT-PCR asymétrique décrite ci-dessus.

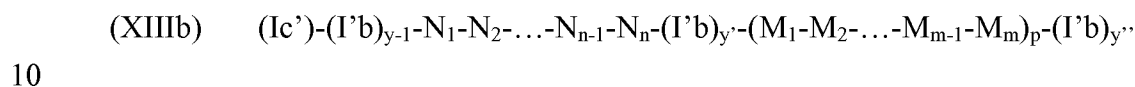
Les résultats présentés dans les figures 21, 22 et 23 montrent que la sonde générique flavivirus, la sonde spécifique Dengue 4 et la sonde générique West Nile virus ne s'hybrident de manière significative qu'avec les amplicons qui correspondent aux virus concernés.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide modifié répondant à la formule (XIIb) :



ou à la formule (XIIIb) :



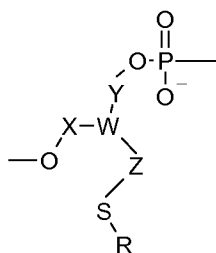
dans lesquelles,

N_1, \dots, N_n représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

M_1, \dots, M_m représentent indépendamment les uns des autres un nucléotide,

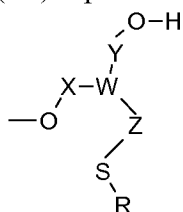
(I'b) représente un composé de formule :

15



20

(Ic') représente un composé de formule :



n est un nombre entier allant de 4 à 100,

m est un nombre entier allant de 4 à 100,

25 y est un nombre entier allant de 2 à 12,

p représente 0 ou 1,

y' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et y' est égal à 0 si p vaut 0,

y'' est un nombre entier allant de 0 à 12 si p vaut 1 et si p vaut 0 alors y'' vaut 0,

la somme des nombres entiers $(y + y')$ ou $(y + y' + y'')$ n'est pas supérieure à 12,

30 X est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,

Y est choisi parmi les groupements alkyles linéaires ou ramifiés en C1-C12, aminoalkyles en C1-C12, alkoxy en C1-C12, cycloalkyles en C3-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12,

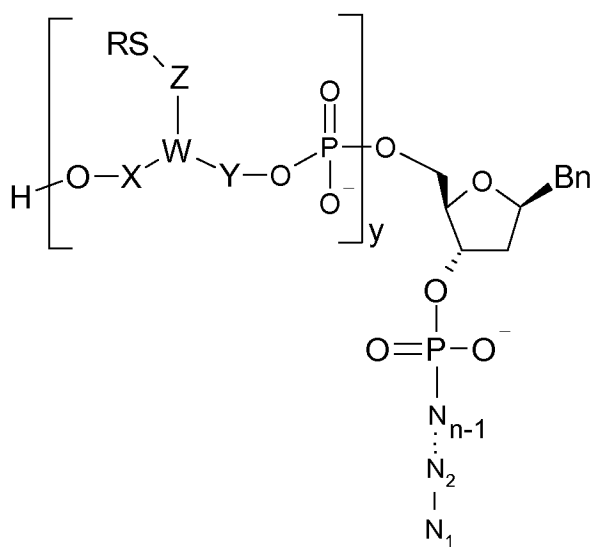
Z est choisi parmi les groupements alkoxy en C1-C12, cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12, NCO-alkyles en C1-C12, CON-alkyles en C1-C12,

W est choisi parmi les groupements alcanes tri-yles en C1-C12, les groupements aryles tri-yles en C6-C18 et les groupements aralcanes tri-yles en C6-C18,

R est H ou est choisi parmi les groupements acyles en C1-C12, S-alkyles en C1-C12, S-aryles en C6-C12, S-2-pyridine, S-hétéroalkyles oxygénés ou azotés en C1-C12, S-cycloalkyles en C3-C12, S-cyclohétéroalkyles oxygénés ou azotés en C3-C12, et

R1 est choisi parmi les groupements 2-cyanoéthyle ou $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$, dans lequel R'_1 , R'_2 et R'_3 sont identiques ou différents et représentent un groupement choisi parmi les alkyles linéaires ou ramifiés comportant de 1 à 12 atomes de carbone et les aryles en C6-C12.

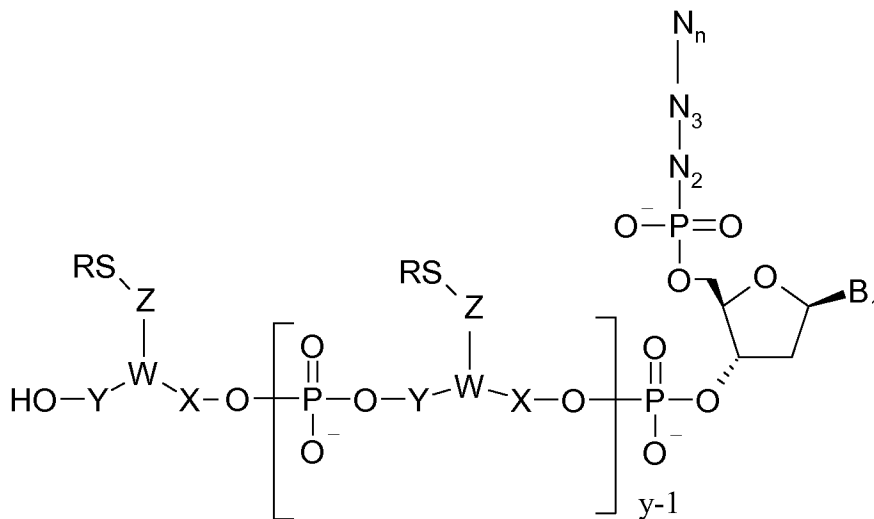
2. Oligonucléotide modifié selon la revendication 1, répondant à la formule :



dans laquelle n , y , N_1, \dots, N_{n-1} , X , Y , Z , W et R ont la même définition que dans la revendication 1, et

B_n représente la base du n -ième nucléotide.

3. Oligonucléotide modifié selon la revendication 1, répondant à la formule :



dans laquelle n, y, N₂,..., N_n, X, Y, Z, W et R ont la même définition que dans la revendication 1, et

B_1 représente la base du 1er nucléotide.

5

4. Oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la séquence de nucléotides (N_1 - N_2 -...- N_{n-1} - N_n) et, éventuellement, la séquence de nucléotides (M_1 - M_2 -...- M_{m-1} - M_m) sont spécifiques d'un virus, d'une bactérie ou d'un gène responsable ou impliqué dans une maladie.

10

5. Oligonucléotide modifié selon la revendication 4, dans lequel la séquence de nucléotides (N_1 - N_2 -...- N_{n-1} - N_n) et, éventuellement, la séquence de nucléotides (M_1 - M_2 -...- M_{m-1} - M_m) sont choisies parmi :

15 - les séquences de SEQ ID NO : 1, de SEQ ID NO : 4, de SEQ ID NO : 27 , de SEQ ID NO : 28, de SEQ ID NO : 35 ou de SEQ ID NO : 36 spécifiques du virus de l'hépatite C (VHC),

- les séquences de SEQ ID NO : 16, de SEQ ID NO : 17 ou de SEQ ID NO : 40, spécifiques des flavivirus,

20 - la séquence de SEQ ID NO : 18 ou de SEQ ID NO : 41, spécifique des virus de la Dengue, ou

- la séquence de SEQ ID NO : 19, spécifique des virus West Nile (WNV).

25 6. Oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la séquence de nucléotides ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) et, éventuellement, la séquence de nucléotides ($M_1-M_2-...-M_{m-1}-M_m$) ont une structure de type anomère alpha, anomère bêta, linéaire, ou « *snail* ».

7. Substrat greffé par au moins un oligonucléotide modifié selon les revendications 1 à 6, ledit substrat comportant au moins une zone de réception revêtue d'une substance tolérant le greffage dudit oligonucléotide modifié.
- 5 8. Substrat greffé selon la revendication 7, dans lequel :
- ladite zone de réception est revêtue d'un film d'or ou de platine, et ledit substrat est en métal, de préférence en cuivre ou en titane, ou
 - ladite zone de réception comporte à sa surface au moins une double liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de
- 10 préférence des fonctions maléimide ou acrylamide, et ledit substrat est en plastique, de préférence en polystyrène.
9. Substrat greffé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel ledit substrat est non planaire, et est de préférence une microparticule ou une nanoparticule.
- 15 10. Méthode de détection d'au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique, comprenant une étape de :
- détection dudit acide nucléique cible avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 6.
- 20 11. Méthode de détection selon la revendication 10, comprenant les étapes :
- d'obtention d'au moins un acide nucléique source à partir dudit échantillon biologique,
 - de production d'un amplicon par amplification dudit acide nucléique cible à partir de
- 25 l'acide nucléique source, et
- de détection de l'hybridation dudit amplicon avec au moins une sonde de détection formée par un oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 6.
- 30 12. Méthode selon la revendication 11, pour déterminer le génotype et/ou le sous-type d'un virus présent dans un échantillon biologique, dans laquelle
- l'amplicon est généré par amplification d'une séquence nucléotidique cible, correspondant à une région génomique du virus portant des informations relatives au génotype et/ou au sous-type viral, et
 - la détection est effectuée avec une sonde spécifique d'un génotype et/ou d'un sous-
- 35 type viral.

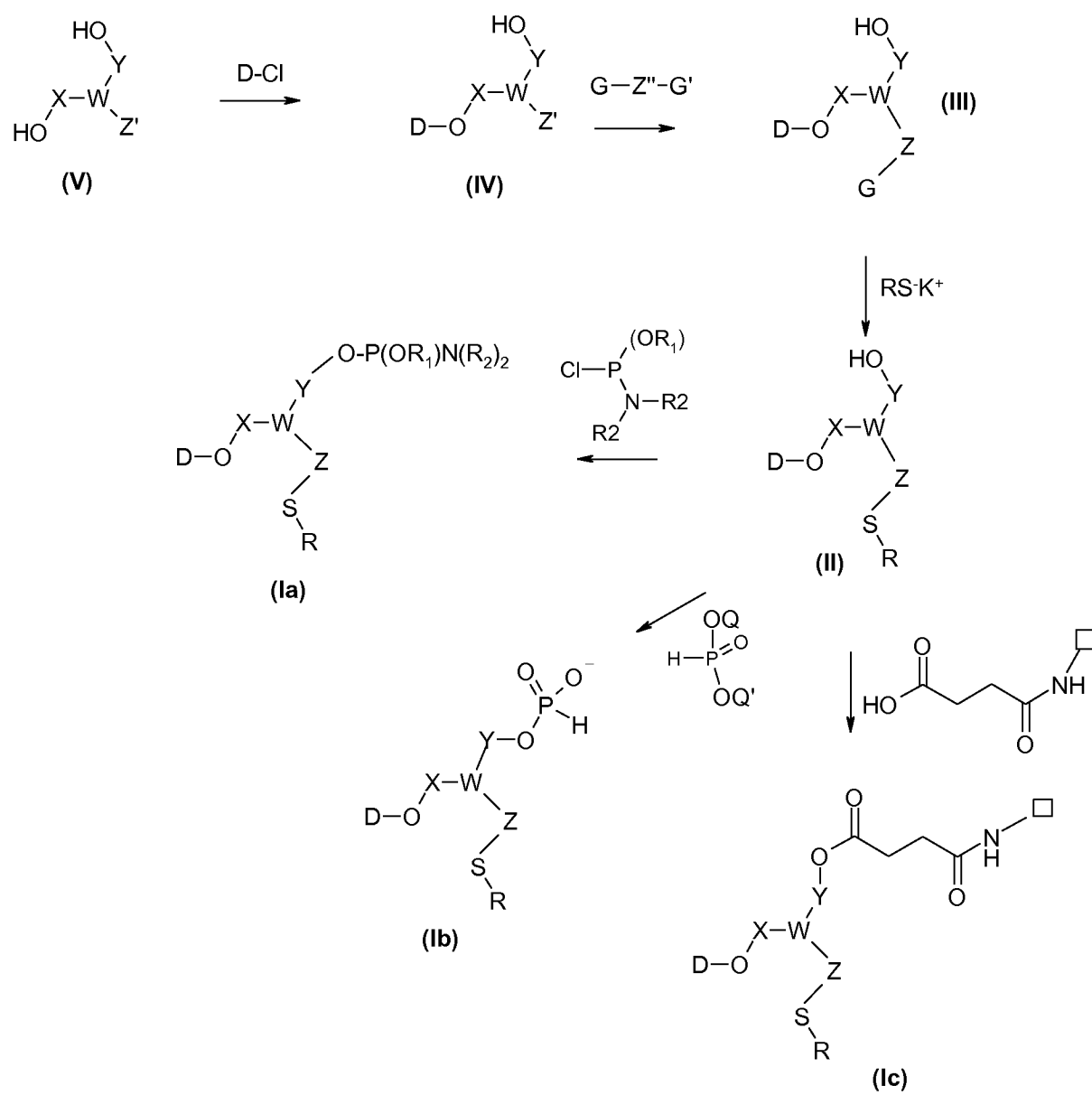
13. Méthode selon la revendication 12, dans laquelle l'étape de production de l'amplicon est réalisée en amplifiant une séquence nucléotidique cible correspondant à une région génomique du virus portant des informations relatives au génotype et/ou au sous-type viral, avec un mélange d'amorces nucléotidiques, de préférence choisies
5 parmi les couples d'amorces :
- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9, lorsque l'amplicon est généré à partir de tout génotype du VHC;
- SEQ ID NO : 10 et SEQ ID NO : 9, lorsque l'amplicon est généré à partir d'un VHC de génotype 1a/1b ;
10 - SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 9, lorsque l'amplicon est généré à partir d'un VHC de génotype 2 ;
- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 11 lorsque l'amplicon est généré à partir d'un VHC de génotype 3a ;
- SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 30, lorsque l'amplicon est généré à partir d'un VHC
15 de génotype 4a/4b ;
- SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21, ou SEQ ID NO : 22 et SEQ ID NO : 21 lorsque l'amplicon est généré à partir d'un flavivirus.
14. Kit de détection d'au moins un acide nucléique cible dans un échantillon
20 biologique comprenant :
- au moins un oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 6 et au moins un substrat comportant au moins une zone de réception revêtue d'une substance tolérant le greffage dudit oligonucléotide modifié, ladite zone de réception étant de préférence revêtue d'or, de platine ou comportant à sa surface au moins une double
25 liaison carbone-carbone ou une triple liaison carbone-carbone ou des fonctions halogénoacétamide, de préférence des fonctions maléimide ou acrylamide, ou
- au moins un substrat greffé selon l'une des revendications 7 à 9.
15. Oligonucléotide possédant une séquence nucléotidique choisie parmi les
30 séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 27, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 35, SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO : 40 et SEQ ID NO : 41.
16. Utilisation d'un oligonucléotide modifié selon l'une des revendications 1 à 6, d'un
35 oligonucléotide selon la revendication 15 ou d'un substrat greffé selon l'une des revendications 7 à 9 pour détecter au moins un acide nucléique cible dans un échantillon biologique.

17. Utilisation selon la revendication 16, pour le diagnostic, le génotypage ou le séquençage de souches virales, de préférence de virus des hépatites, ou d'arbovirus de préférence les *Flaviviridae*, les *Togaviridae* ou les *Bunyaviridae*.

5

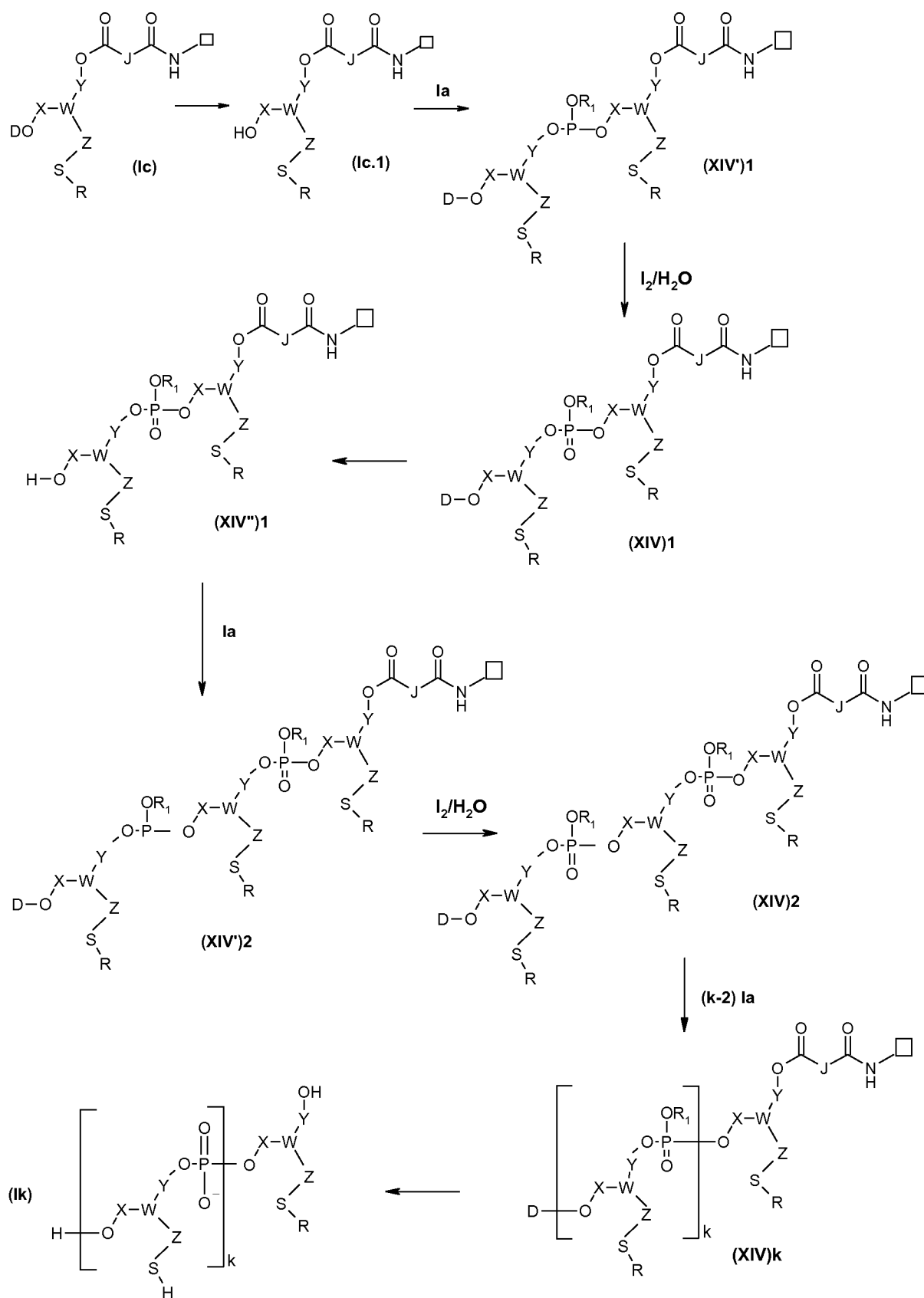
18. Utilisation selon la revendication 17, pour le diagnostic, le génotypage ou le séquençage du VHC, du VHB, des virus de la Dengue ou du virus West Nile.

Figure 1



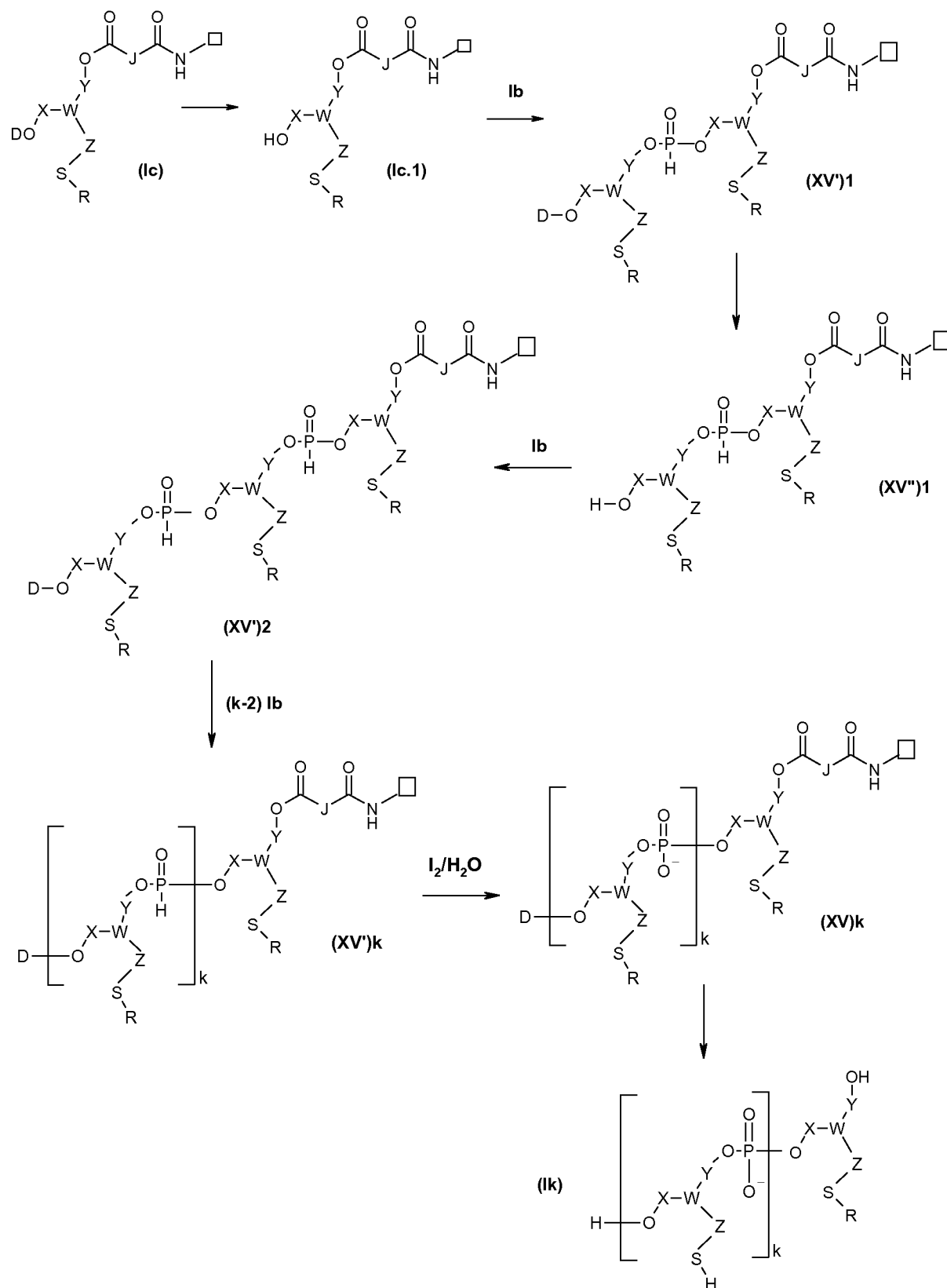
2/24

Figure 2A



3/24

Figure 2B



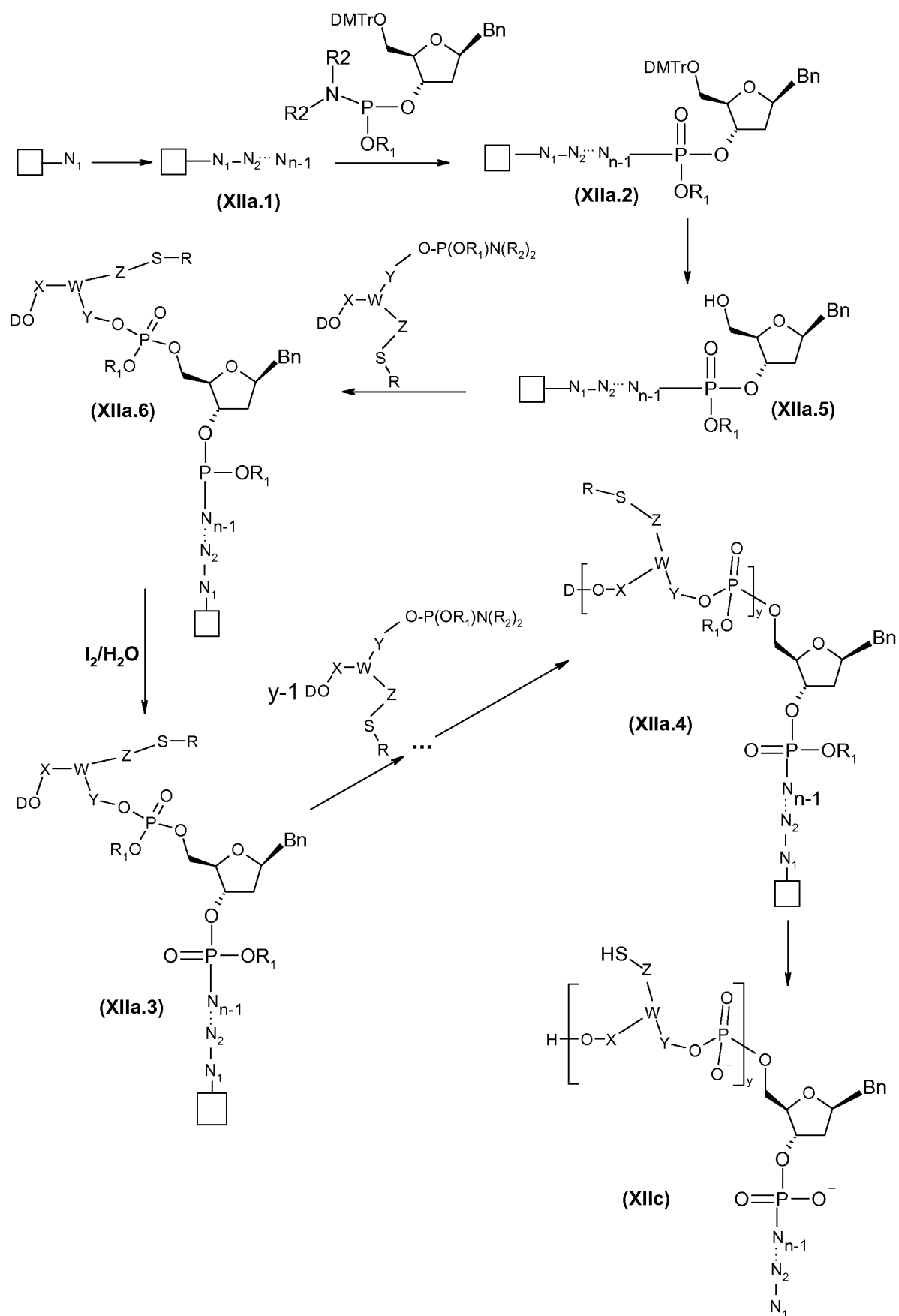
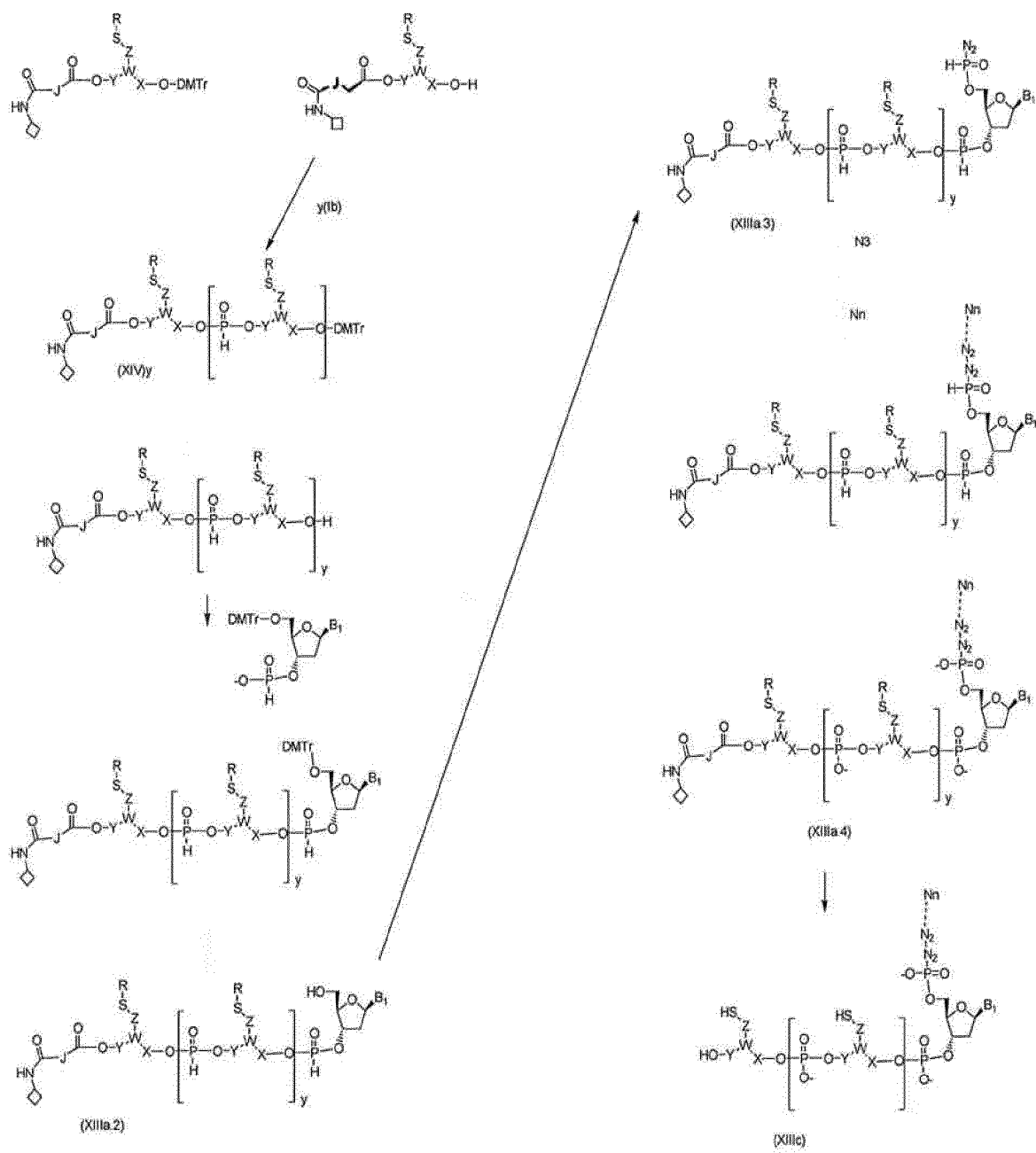


Figure 4



6/24

Figure 5

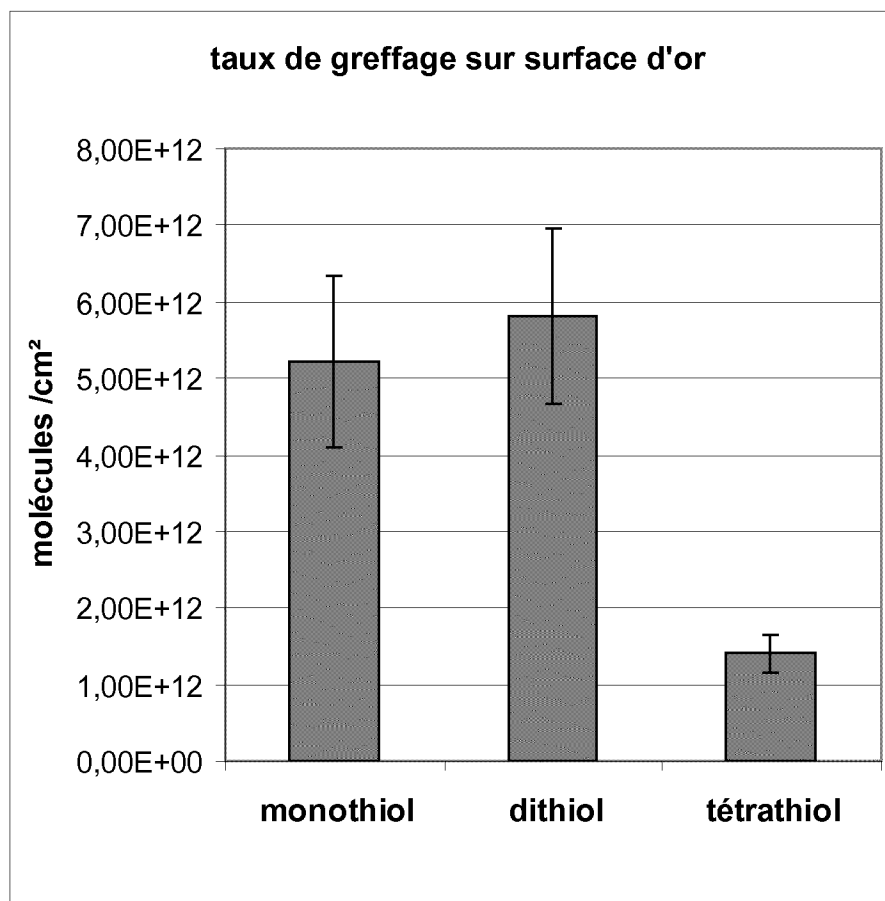


Figure 6

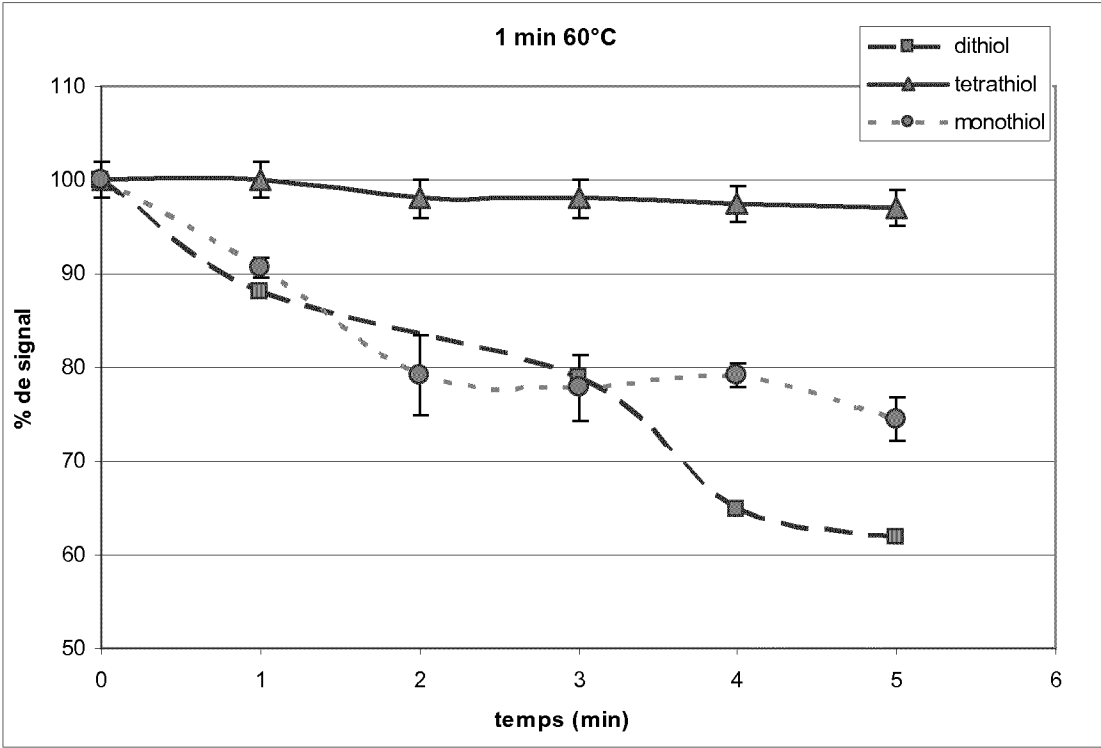


Figure 7

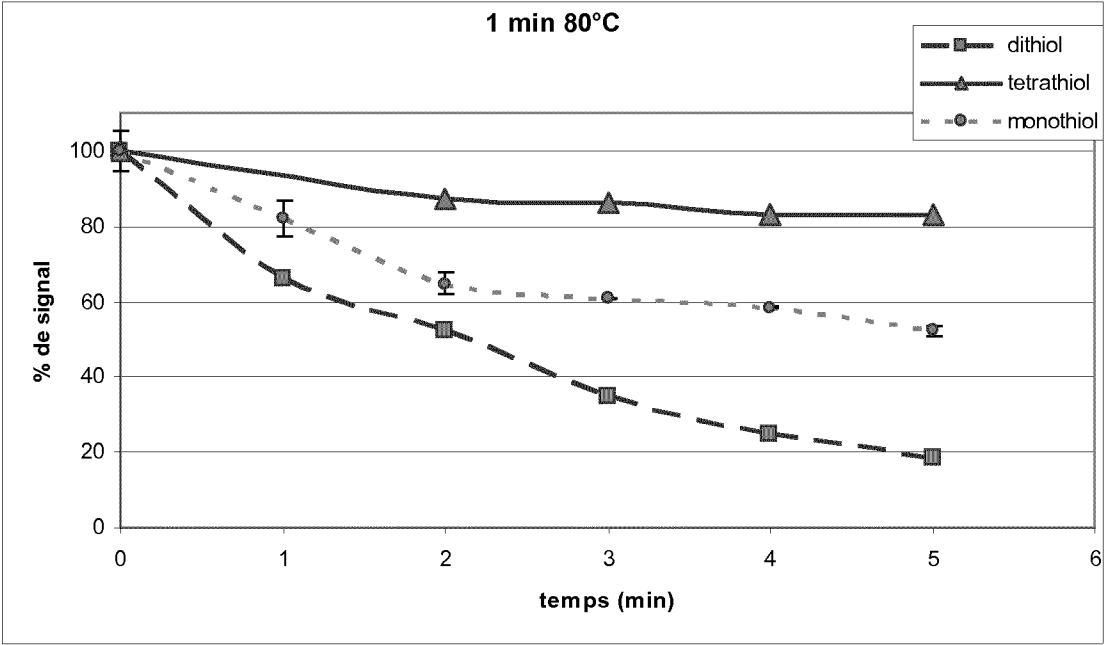
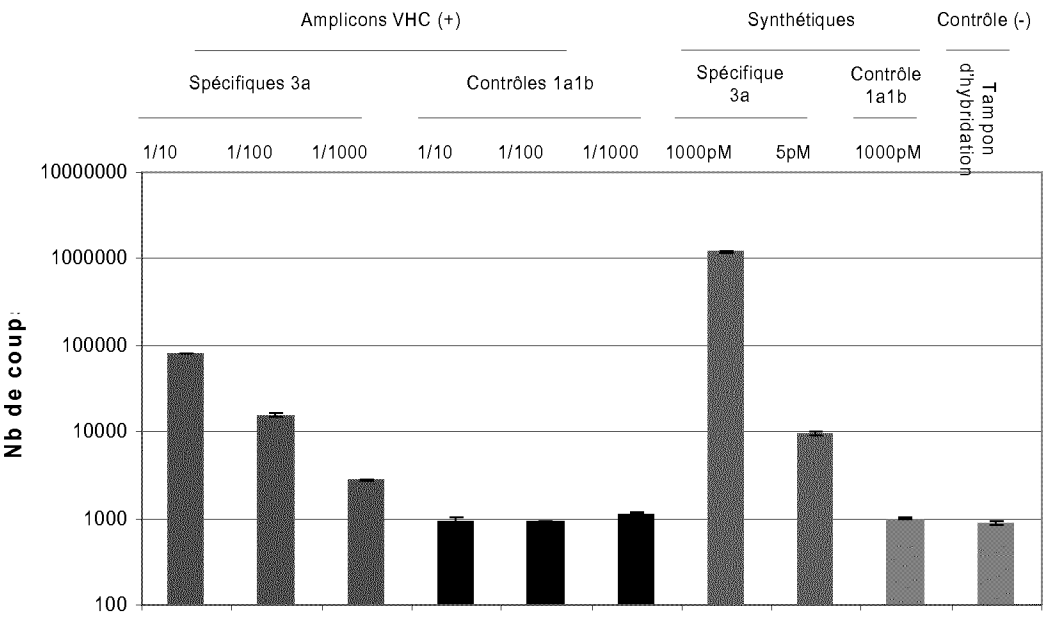
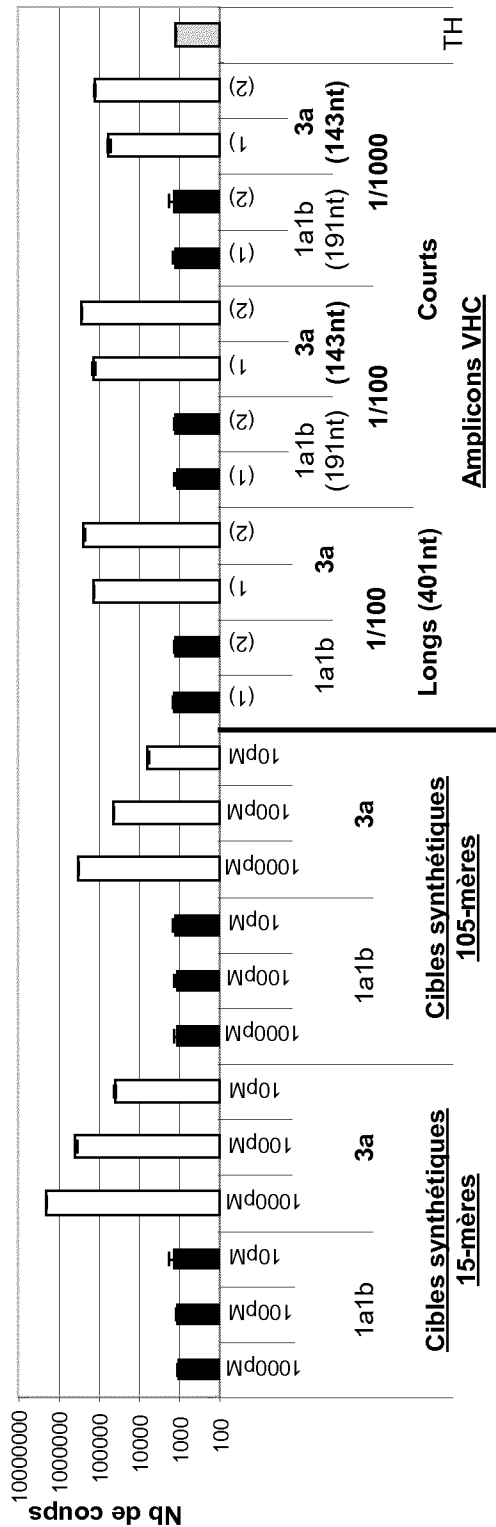


Figure 8



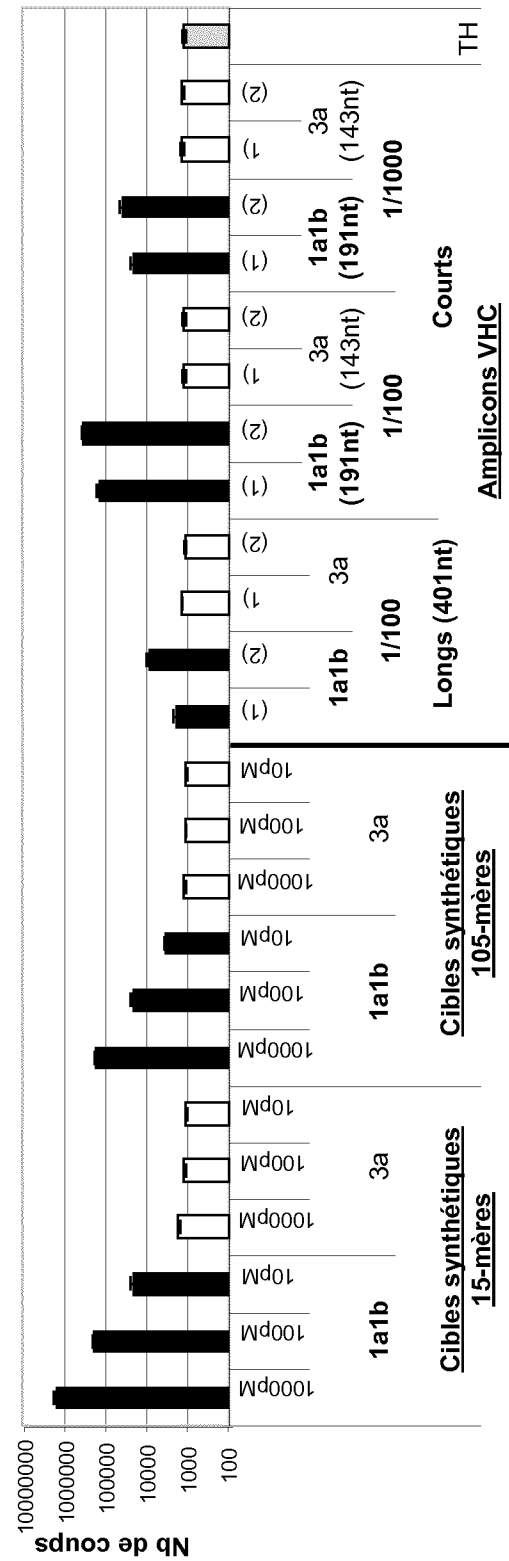
10/24

Figure 9



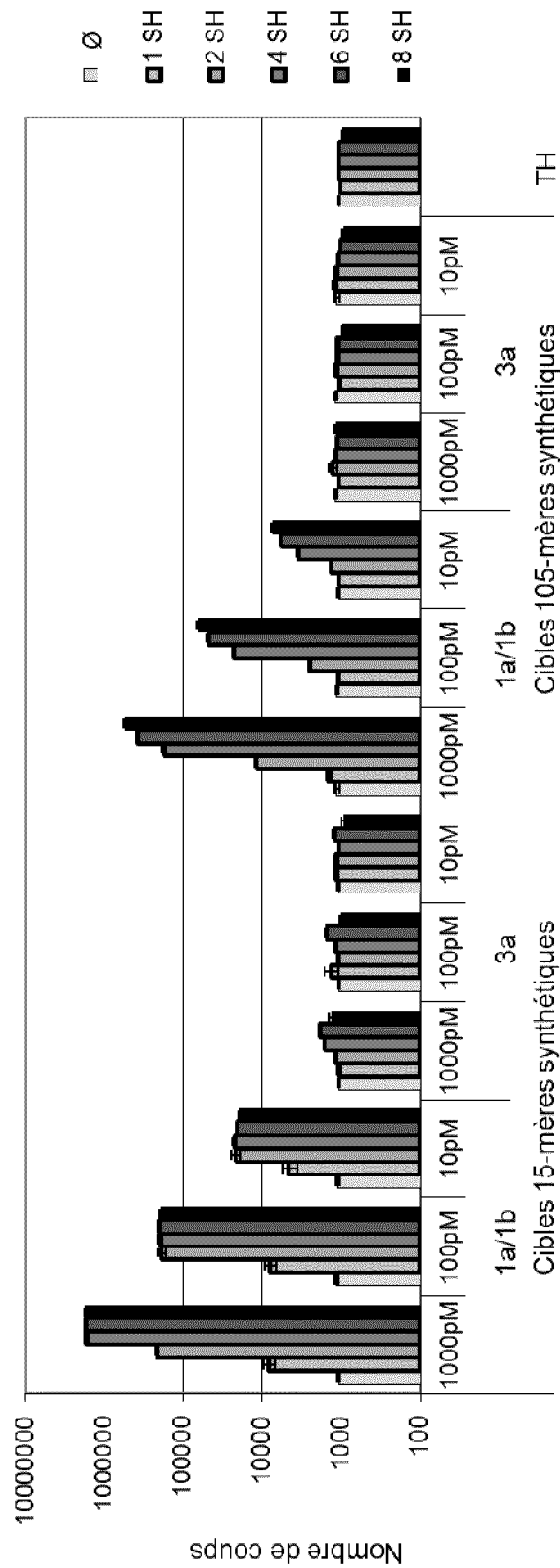
11/24

Figure 10

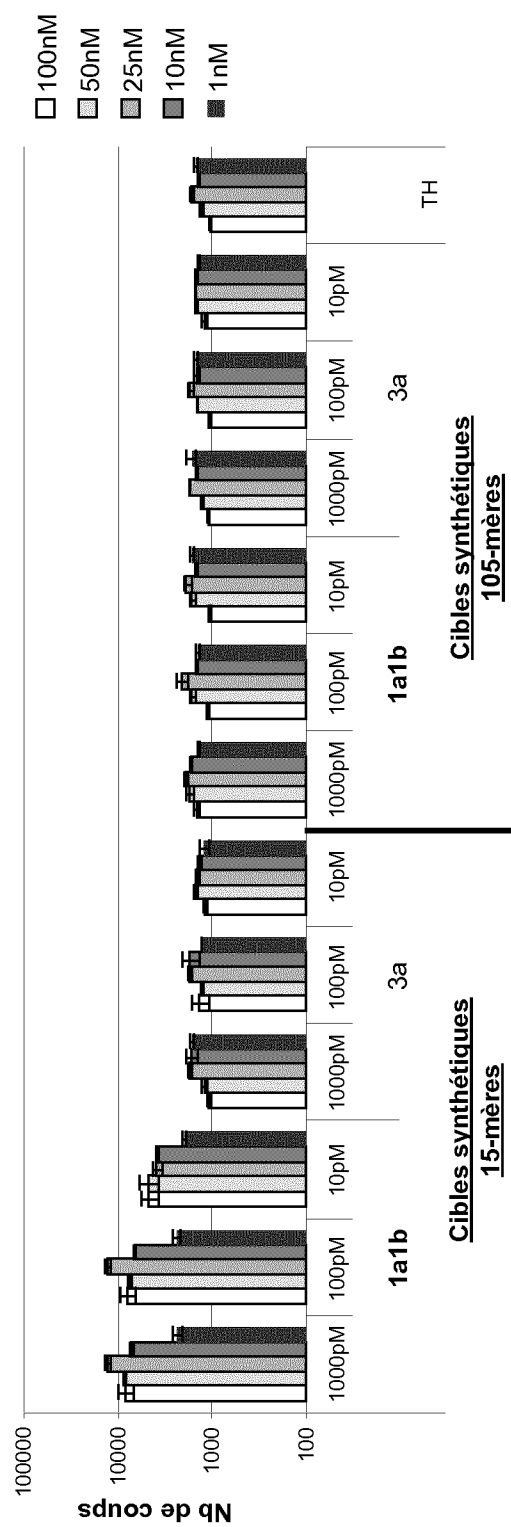


12/24

Figure 11

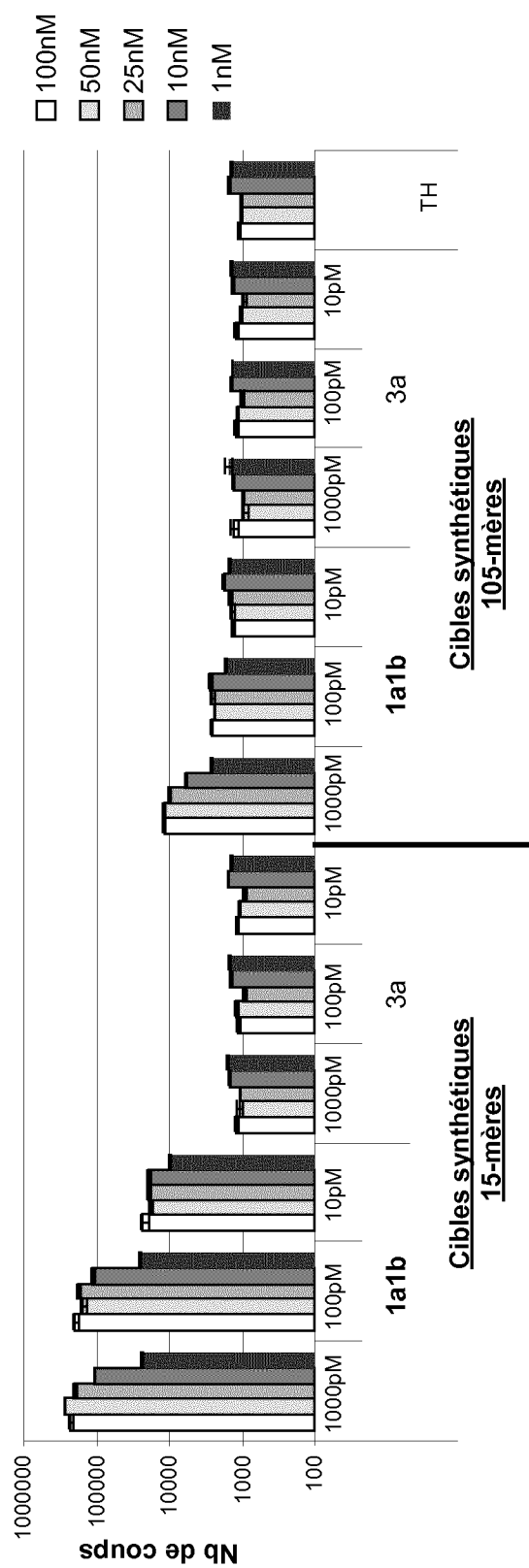


13/24
Figure 12



14/24

Figure 13



15/24

Figure 14

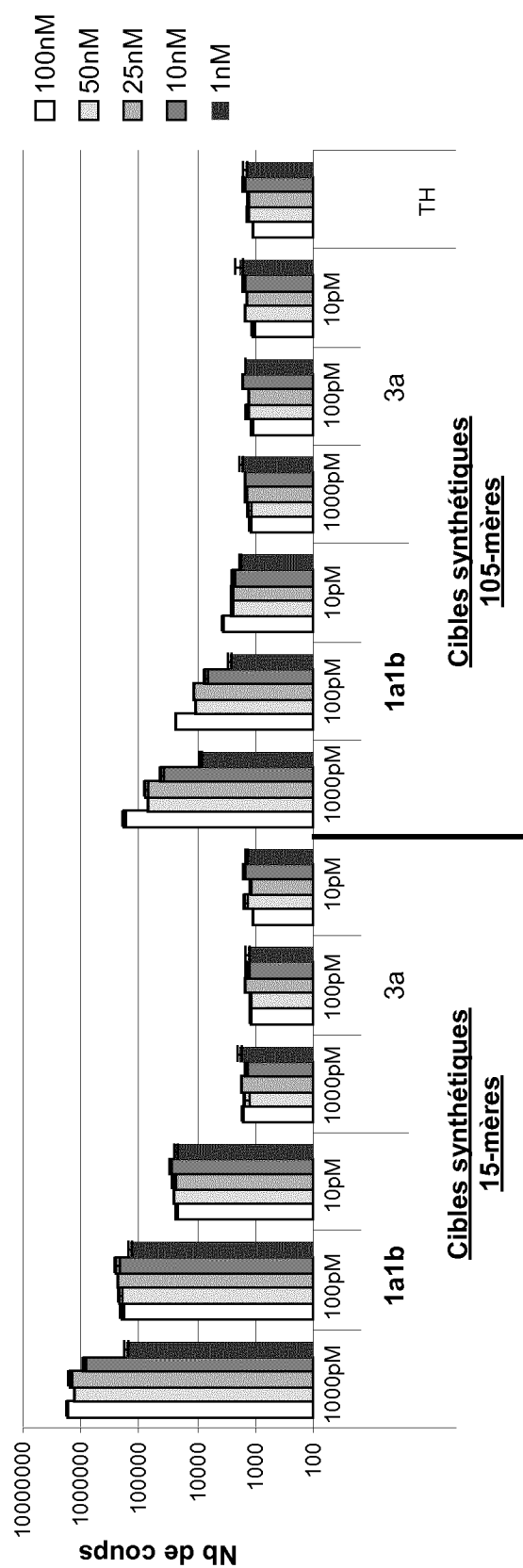
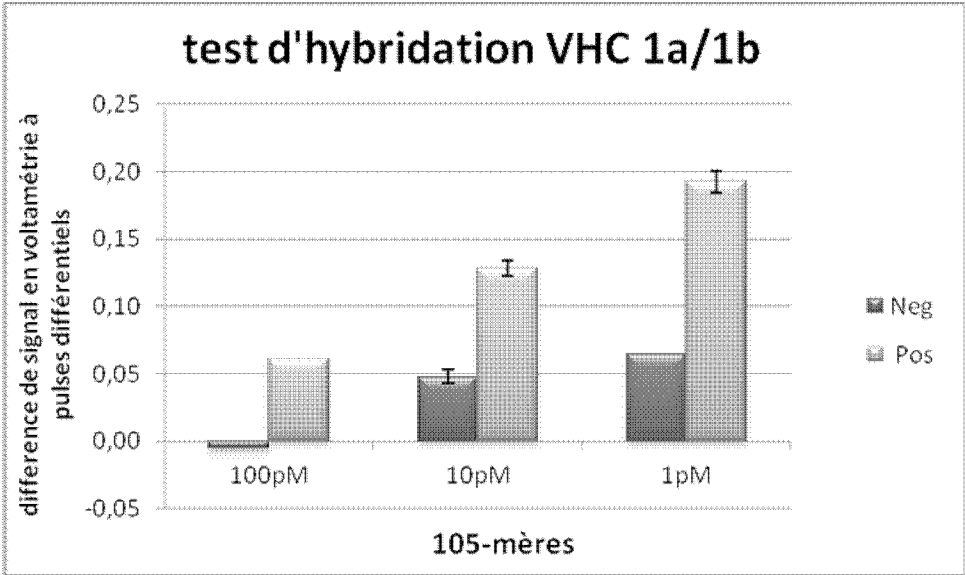


Figure 15



17/24

Figure 16a

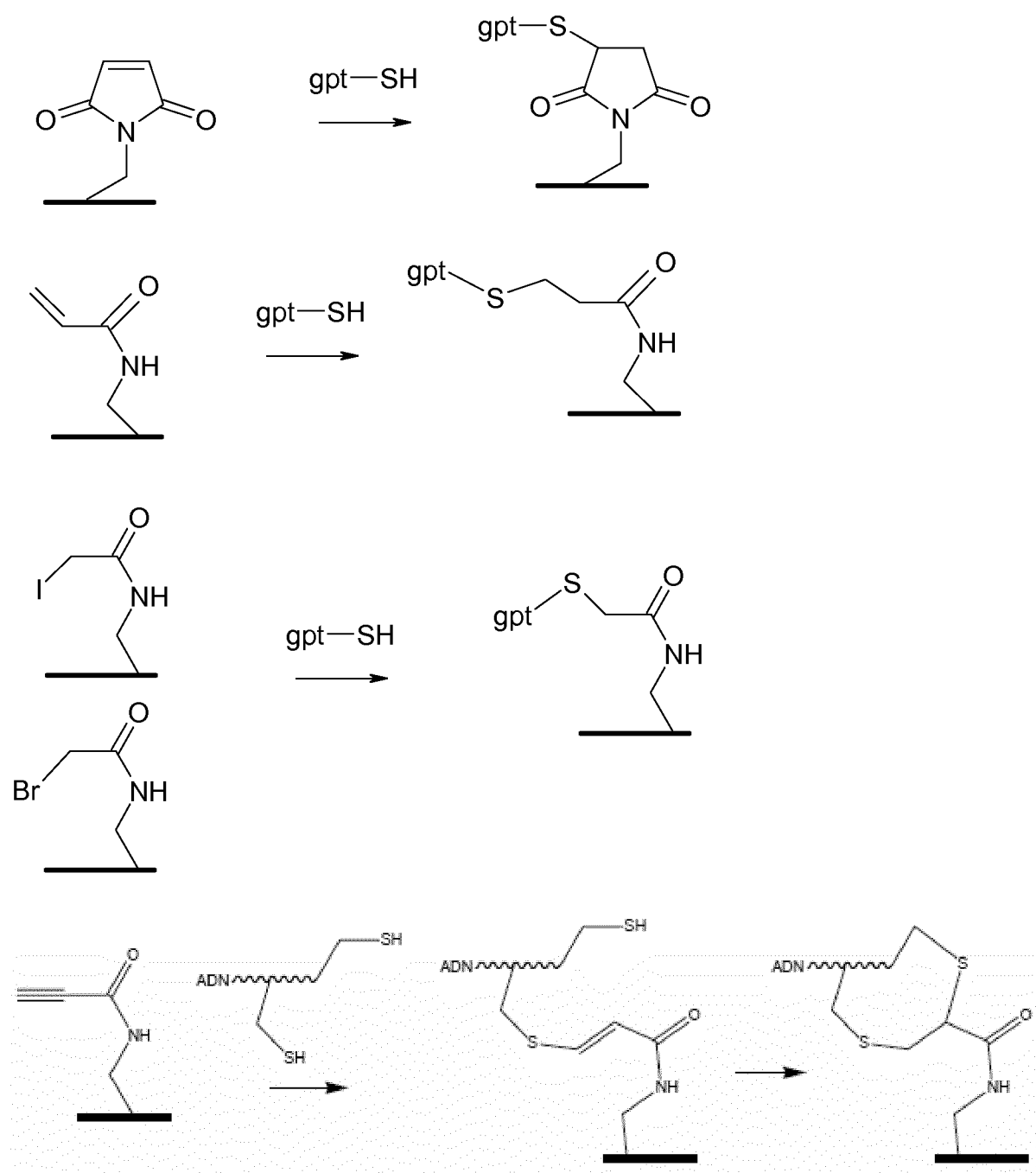


Figure 17

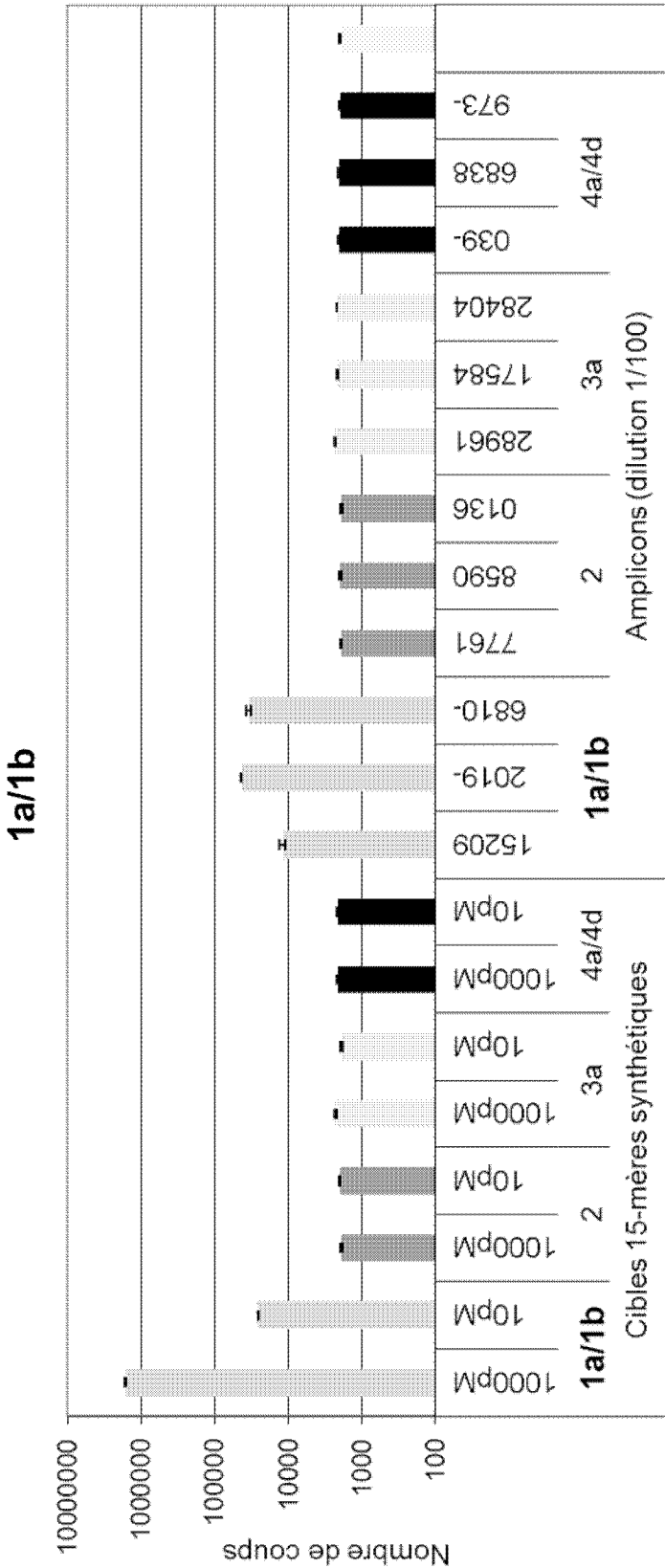


Figure 18

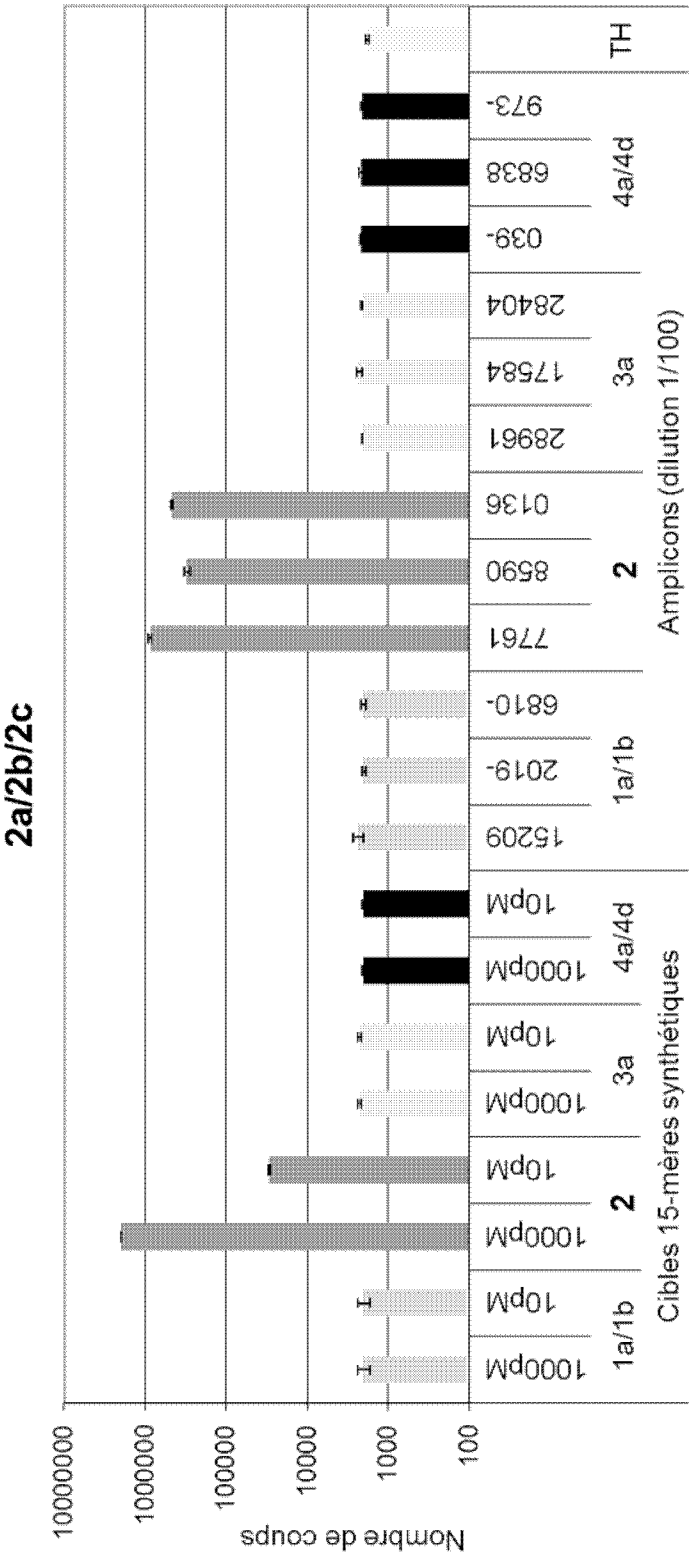


Figure 19

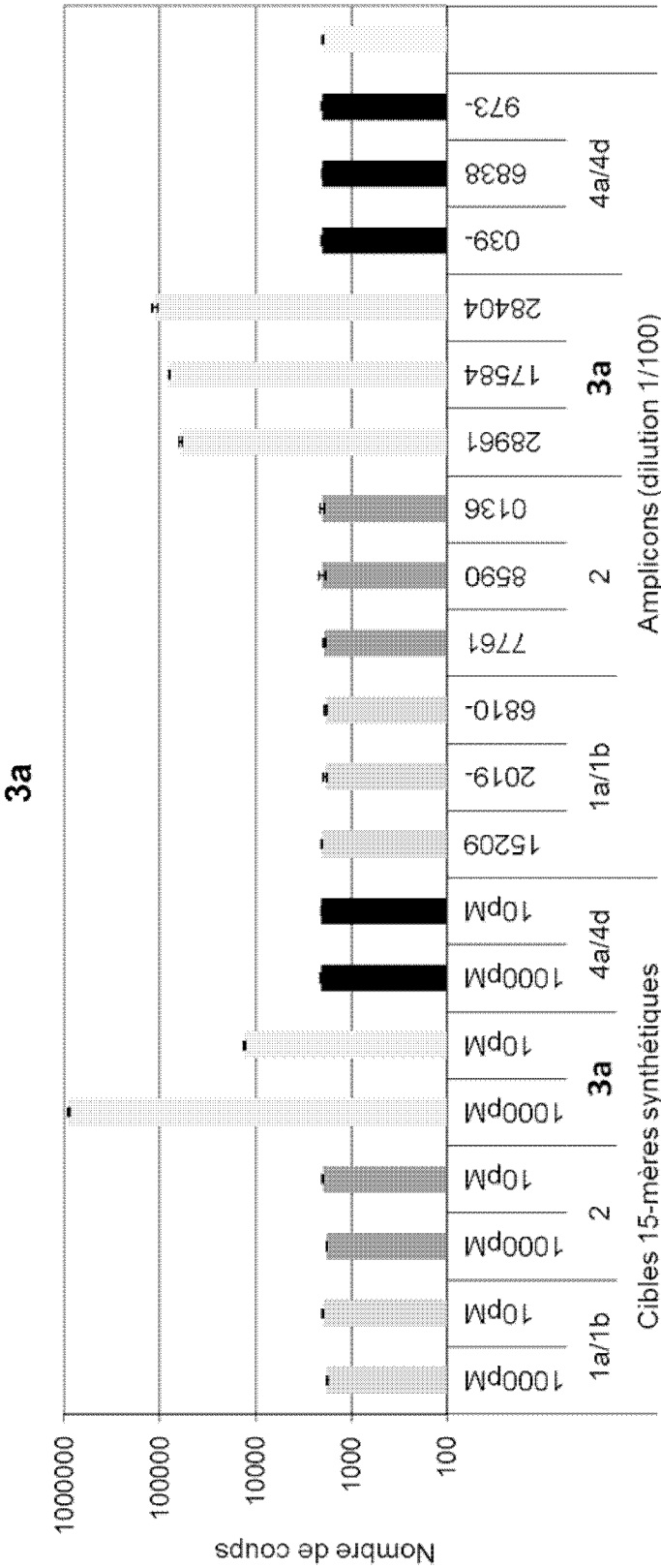
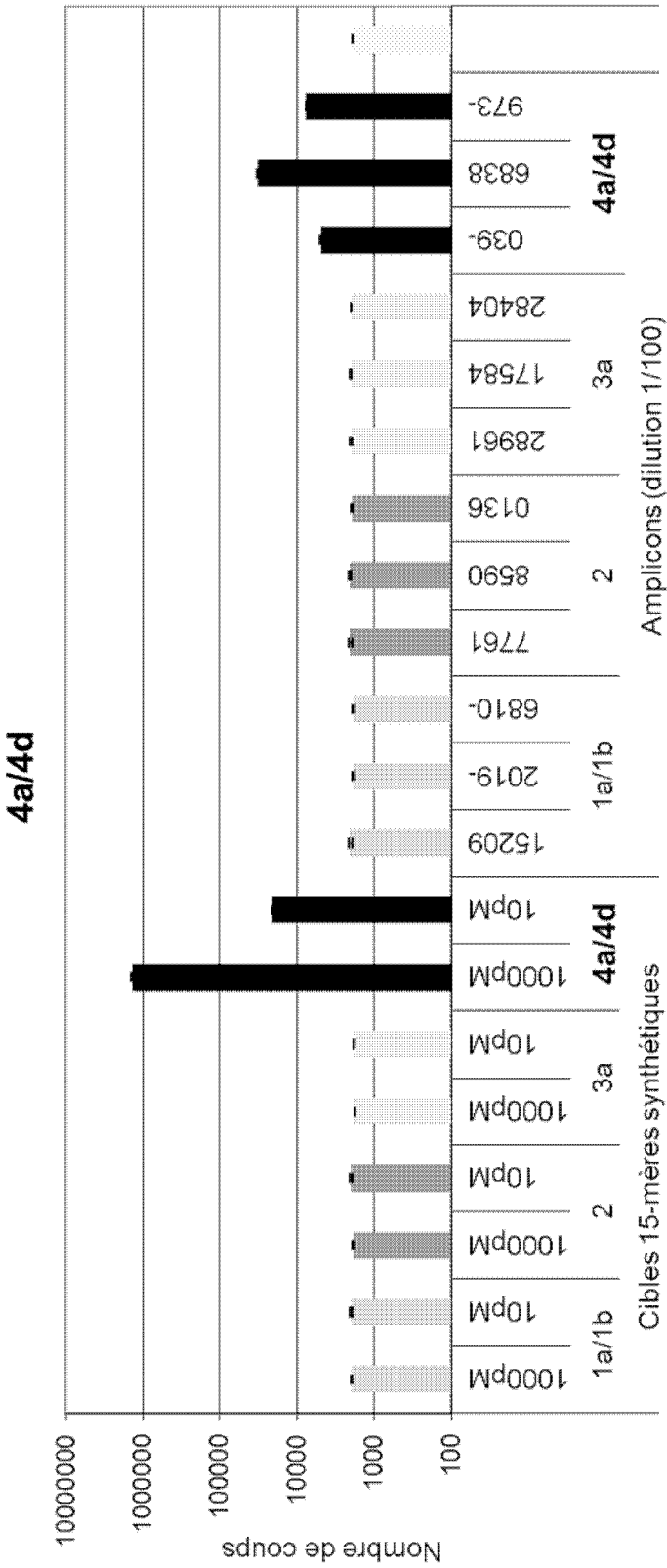


Figure 20



23/24

Figure 21

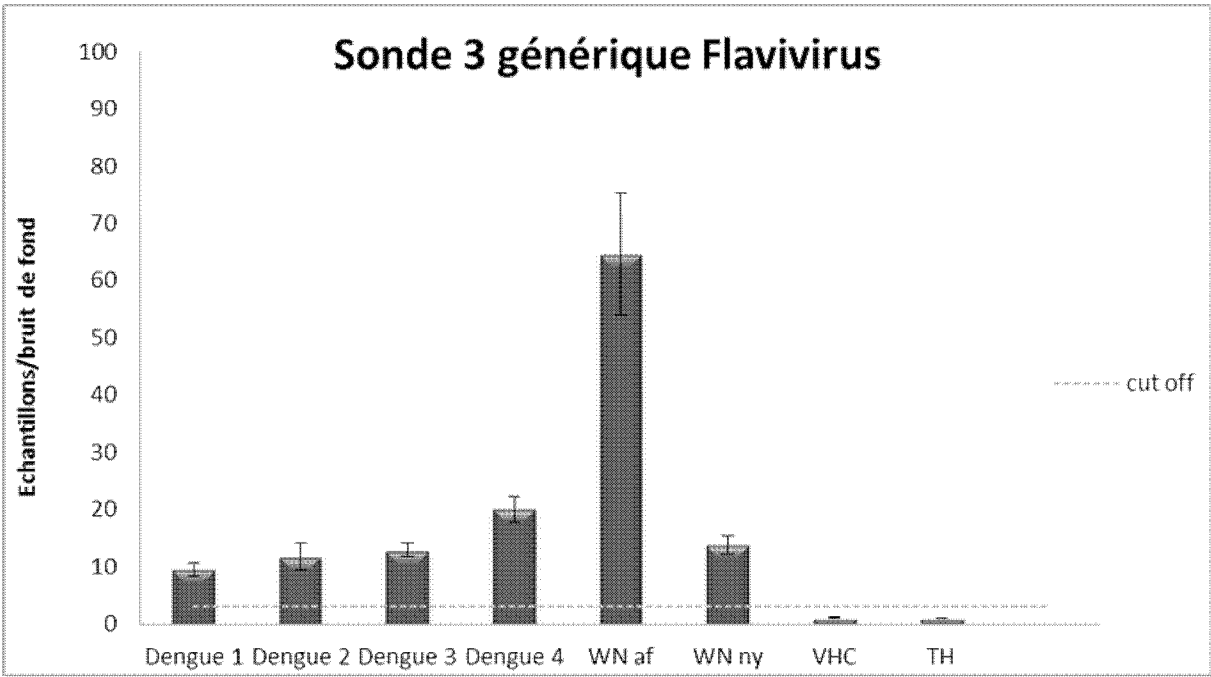


Figure 22

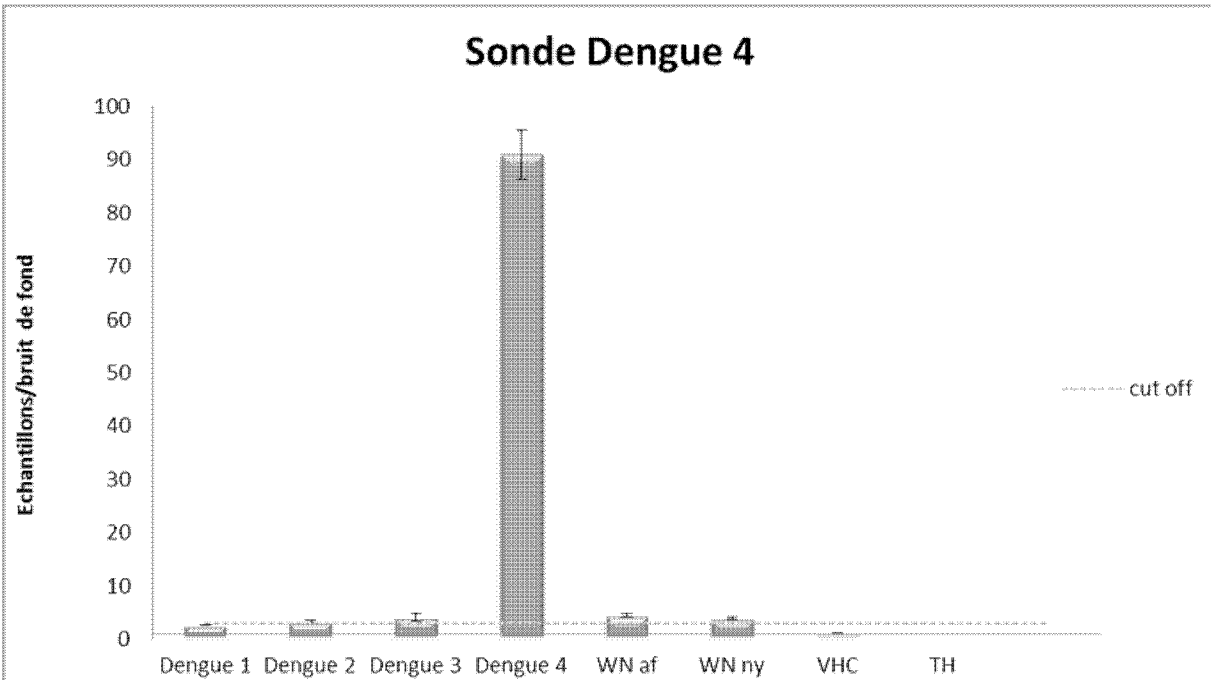
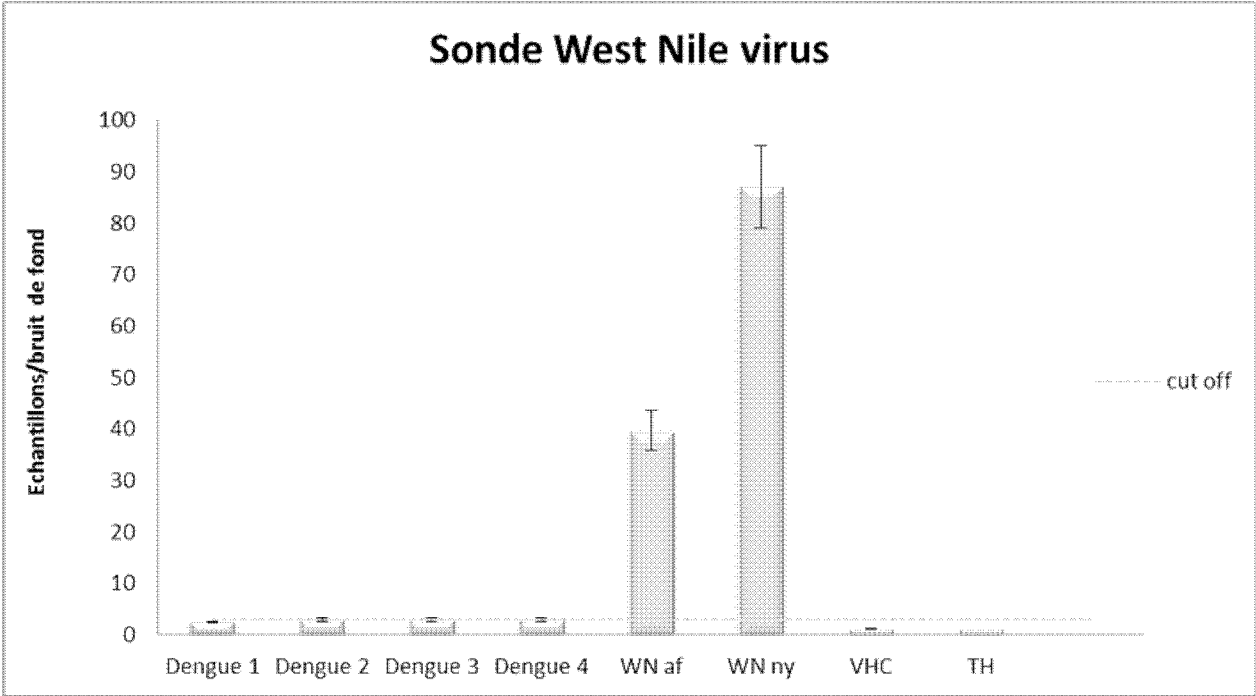


Figure 23



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/057150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H21/00 C07H21/04 G01N33/50
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6 041183 A (MITSUBISHI CHEM IND) 15 February 1994 (1994-02-15) the whole document -----	1-18
A	US 7 601 848 B2 (HARTWICH GERHARD [DE] ET AL) 13 October 2009 (2009-10-13) cited in the application the whole document -----	1-18
A	EP 0 523 978 A1 (JOLLA PHARMA [US]) 20 January 1993 (1993-01-20) cited in the application the whole document -----	1-18
A	WO 2005/065405 A1 (GENENCOR INT [US]; SALA RAFAEL FERNANDO [US]) 21 July 2005 (2005-07-21) the whole document -----	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2013

Date of mailing of the international search report

23/05/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klein, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/057150

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 6041183	A	15-02-1994	
US 7601848	B2	13-10-2009	
		AU 2002364378 A1	15-07-2003
		DE 10163836 A1	10-07-2003
		EP 1626952 A2	22-02-2006
		US 2005153291 A1	14-07-2005
		WO 03055852 A2	10-07-2003
EP 0523978	A1	20-01-1993	
		AT 179982 T	15-05-1999
		AU 664184 B2	09-11-1995
		AU 686911 B2	12-02-1998
		AU 703715 B2	01-04-1999
		CA 2073846 A1	16-01-1993
		DE 69229149 D1	17-06-1999
		DE 69229149 T2	09-12-1999
		DK 0523978 T3	01-11-1999
		EP 0523978 A1	20-01-1993
		ES 2131060 T3	16-07-1999
		GR 3030260 T3	31-08-1999
		HK 1014369 A1	14-04-2000
		IE 922292 A1	27-01-1993
		JP 2899111 B2	02-06-1999
		JP 3188243 B2	16-07-2001
		JP 3488435 B2	19-01-2004
		JP H07500576 A	19-01-1995
		JP H11228592 A	24-08-1999
		JP 2001302684 A	31-10-2001
		PT 100691 A	29-10-1993
		WO 9302093 A1	04-02-1993
WO 2005065405	A1	21-07-2005	
		AU 2004311455 A1	21-07-2005
		CA 2550854 A1	21-07-2005
		EP 1699420 A1	13-09-2006
		US 2005250128 A1	10-11-2005
		WO 2005065405 A1	21-07-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2013/057150

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07H21/00 C07H21/04 G01N33/50 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07H G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JP 6 041183 A (MITSUBISHI CHEM IND) 15 février 1994 (1994-02-15) le document en entier -----	1-18
A	US 7 601 848 B2 (HARTWICH GERHARD [DE] ET AL) 13 octobre 2009 (2009-10-13) cité dans la demande le document en entier -----	1-18
A	EP 0 523 978 A1 (JOLLA PHARMA [US]) 20 janvier 1993 (1993-01-20) cité dans la demande le document en entier -----	1-18
A	WO 2005/065405 A1 (GENENCOR INT [US]; SALA RAFAEL FERNANDO [US]) 21 juillet 2005 (2005-07-21) le document en entier -----	1-18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 mai 2013</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">23/05/2013</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Klein, Didier</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2013/057150

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 6041183	A	15-02-1994	-----	
US 7601848	B2	13-10-2009	AU 2002364378 A1	15-07-2003
			DE 10163836 A1	10-07-2003
			EP 1626952 A2	22-02-2006
			US 2005153291 A1	14-07-2005
			WO 03055852 A2	10-07-2003
EP 0523978	A1	20-01-1993	AT 179982 T	15-05-1999
			AU 664184 B2	09-11-1995
			AU 686911 B2	12-02-1998
			AU 703715 B2	01-04-1999
			CA 2073846 A1	16-01-1993
			DE 69229149 D1	17-06-1999
			DE 69229149 T2	09-12-1999
			DK 0523978 T3	01-11-1999
			EP 0523978 A1	20-01-1993
			ES 2131060 T3	16-07-1999
			GR 3030260 T3	31-08-1999
			HK 1014369 A1	14-04-2000
			IE 922292 A1	27-01-1993
			JP 2899111 B2	02-06-1999
			JP 3188243 B2	16-07-2001
			JP 3488435 B2	19-01-2004
			JP H07500576 A	19-01-1995
			JP H11228592 A	24-08-1999
			JP 2001302684 A	31-10-2001
			PT 100691 A	29-10-1993
			WO 9302093 A1	04-02-1993
WO 2005065405	A1	21-07-2005	AU 2004311455 A1	21-07-2005
			CA 2550854 A1	21-07-2005
			EP 1699420 A1	13-09-2006
			US 2005250128 A1	10-11-2005
			WO 2005065405 A1	21-07-2005
