

(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
9 mars 2006 (09.03.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/024737 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,
C07H 21/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001904

(22) Date de dépôt international : 22 juillet 2005 (22.07.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0408645 4 août 2004 (04.08.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cédex 16 (FR). **INSTITUT PASTEUR** [FR/FR]; 25-28,
rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BEHR,**
Charlotte [FR/FR]; 106, rue Quintin, F-33000 Bordeaux
(FR). **BOEUF, Philippe** [FR/AU]; Unit 4, 1-9 O'Connor
Street, East Brunswick, VIC 3057 (AU).

(74) Mandataires : **DESAIX, Anne** etc.; **ERNEST GUT-**
MANN - YVES PLASSERAUD SAS, 3, rue Chau-
veau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: QUANTIFYING MRNA OF PROTEINS OF INTEREST USING A REAL-TIME RT-PCR REACTION

(54) Titre : QUANTIFICATION DES ARNm DE PROTEINES D'INTERET AU MOYEN D'UNE REACTION RT-PCR EN
TEMPS REEL

(57) Abstract: The invention concerns the field of quantification of RNA's in a biological sample, in particular quantification of
messenger RNA's coding for cytokines. The invention enables the level of messenger RNA's of human cytokines present in a bio-
logical sample to be absolutely quantified, through a real-time RT-PCR technique based on the use of highly specific primers, the
detection of amplifications by incorporating a fluorescent intercalator, and the absolute quantification by using internal (constitu-
tive genes) and external reference RNA standard range) norms. The invention concerns the simultaneous quantification of different
RNA's, in the same experimental conditions.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la quantification des ARN dans un échantillon biologique, en particulier
la quantification des ARN messagers codant pour des cytokines. La présente invention permet une quantification absolue des taux
d'ARN messagers de cytokines humaines présents dans un échantillon biologique, par une technique de RT-PCR en temps réel repo-
sant sur l'utilisation d'amorces hautement spécifiques, la détection des amplifications par incorporation d'un intercalant fluorescent,
et la quantification absolue grâce à des standards ARN internes (gènes de ménage) et externes (gamme standard ARN de référence).
La présente invention concerne la quantification simultanée d'ARN différents, dans les mêmes conditions expérimentales.

WO 2006/024737 A2

QUANTIFICATION DES ARNm DE PROTÉINES D'INTÉRÊT AU MOYEN D'UNE RÉACTION RT-PCR EN TEMPS RÉEL

La présente invention concerne le domaine de la quantification des ARN dans un échantillon biologique, notamment la quantification des ARN messagers codant pour des cytokines. La présente invention concerne la quantification simultanée d'ARN différents, dans les mêmes conditions expérimentales.

La quantification des ARN messagers et des ARN viraux est un outil potentiel présentant un grand intérêt, tant dans le domaine de la recherche, que dans le domaine clinique. En particulier, les taux d'ARN messagers spécifiques de cytokines représentent des marqueurs très sensibles de l'état d'activation du système immunitaire *in vivo*. Dans le domaine de la recherche, la connaissance de ces taux dans différents modèles peut donc permettre une meilleure connaissance du système immunitaire. Bien évidemment, la connaissance de ces taux est également une information capitale pour bon nombre de situations cliniques. Connaître précisément le niveau d'expression de telle ou telle cytokine, peut en effet être un paramètre important pour la prise en charge des patients souffrant de maladies inflammatoires, infectieuses ou immunes. Un exemple d'application de la quantification des ARN messagers codant pour certaines cytokines, pour évaluer un état pathologique chez un patient souffrant d'arthrite rhumatoïde, est décrit dans le brevet US 6,555,320.

Un des moyens utilisables pour quantifier les ARN messagers est la RT-PCR. La « RT-PCR » est un acronyme couramment utilisé en biologie moléculaire, pour « *reverse transcription – polymerase chain reaction* », ou transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase. Ce type de réaction comporte donc deux étapes : une étape de transcription inverse, c'est-à-dire de synthèse d'un ADN simple brin complémentaire d'une séquence d'ARN, et une étape d'amplification en chaîne par polymérase. La première est ici désignée soit par le terme « transcription inverse », soit par l'acronyme anglophone *RT*. De même, la deuxième phase sera désignée soit par l'expression « amplification en

chaîne par polymérase », soit par l'acronyme francophone ACP, soit par l'acronyme anglophone *PCR*, plus couramment utilisé par les biologistes.

Par rapport à la détection des cytokines correspondantes dans les liquides biologiques ou sur coupe par immuno-histochimie, la détection des ARN messagers par RT-PCR est une technique beaucoup plus sensible permettant la détection dans des échantillons de très petite taille, comme les biopsies de peau. Les autres techniques de détection des ARN messagers, comme la *RnaseProtectionAssay* (Kits RPA, BD-BiosciencesTM) et les techniques de *Northern Blot* (QuantikineTM mRNA, R&DTM) nécessitent parfois plus de 10 µg d'ARN total pour la détection d'une seule cytokine, quantité qui n'est pas toujours atteinte pour de nombreux prélèvements cliniques, notamment dans les biopsies. Outre la nécessité d'une grande quantité de matériel de départ, ces techniques sont très longues à mettre en place et peuvent faire appel à l'utilisation de la radioactivité.

La RT-PCR est une technique très sensible, puisqu'elle permet d'atteindre une augmentation importante du nombre initial de cible. Elle est de plus facile et rapide à mettre en œuvre. Cependant, de très petites variations dans l'efficacité de la RT et/ou de la PCR peuvent affecter de façon très significative le résultat final. Il est donc nécessaire de contrôler à la fois les phases de RT et de PCR. Les techniques conventionnelles qui sont basées sur la RT-PCR au plateau ne permettent pas une quantification absolue, car les résultats sont acquis pendant la phase de saturation. Les techniques compétitives, où sont co-amplifiés la cible et un standard interne avec la même efficacité, pallient cet inconvénient, mais présentent une sensibilité moindre en raison de la co-amplification de deux séquences distinctes. De ce fait, elles nécessitent de grandes quantités de matériels, et ne peuvent être mises en œuvre que pour des rapports cible / compétiteur d'étendue limitée (entre 1:10 et 10:1 généralement). De plus, un précriblage est en général nécessaire pour estimer l'ordre de

grandeur dans lequel se situe la quantité de transcrit à détecter. Enfin, l'analyse des résultats est longue et fastidieuse (Bustin 2000).

Les techniques de PCR en temps réel ont ouvert la voie de la quantification absolue (Bustin 2000; Ginzinger 2002). En effet, la détection du produit d'amplification se fait en temps réel (d'où leur dénomination) grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents. La quantification des transcrits se fait pendant la phase exponentielle, seule phase où la quantité d'amplicon n'est dépendante que de la quantité initiale de cible. L'adjonction d'un standard externe permet alors une quantification absolue si celui-ci est amplifié avec la même efficacité. Cette technique est par ailleurs plus facile à automatiser, et l'analyse des résultats relativement simple. Ceci explique qu'elle soit de plus en plus utilisée malgré un coût qui reste élevé (Bustin 2000; Giulietti, Overbergh et al. 2001).

Les dosages de cytokines utilisant la RT-PCR en temps réel utilisent pour la plupart des sondes fluorescentes (*Taqman*TM, *molecular beacon*TM, etc...) pour détecter l'amplicon (Stordeur, Poulin et al. 2002). Cette approche est intéressante car seul l'amplicon désiré est détecté en dépit de possibles amplifications non-spécifiques. Cependant, l'utilisation de ces sondes fluorescentes entraîne un surcoût non négligeable. De plus, la moins grande exigence sur la spécificité des amorces a pour revers des biais éventuels importants dans la quantification. En effet, dans les cas où les amorces ne sont pas totalement spécifiques, plusieurs amplifications sont susceptibles d'être réalisées en compétition. Par ailleurs, ces techniques utilisent toutes une gamme standard ADN, et ne prennent donc aucunement en compte, dans leur quantification, l'efficacité de la phase de transcription inverse. La transcription inverse a pourtant une efficacité variable, comme cela est exposé à l'exemple 1.2 ci-après. De ce fait, une quantification d'ARN messenger basée sur une réaction de RT-PCR en temps réel utilisant comme standard externe une gamme d'ADN ne peut prétendre être une quantification absolue.

La présente invention a pour objet de pallier au moins en partie aux inconvénients mentionnés ci-dessus, et de permettre une quantification absolue des taux d'ARN messagers déterminés, et en particulier d'ARN messagers de cytokines humaines présents dans un échantillon biologique. Pour cela, l'invention met en oeuvre une technique de RT-PCR en temps réel reposant sur l'utilisation d'amorces hautement spécifiques, la détection des amplifications par incorporation d'un intercalant fluorescent, et la quantification absolue grâce à des standards ARN internes (gènes de ménage) et externes (gamme standard ARN de référence).

La présente invention porte donc sur un procédé de quantification d'un ou plusieurs ARN déterminés, notamment au moins deux ARN distincts, dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- (i) pour chacun des ARN à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique dudit ARN, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,
- (ii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i), et
- (iii) déduction de la quantité d'ARN dans l'échantillon.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un procédé de quantification absolue d'un ou de plusieurs ARN cibles dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- (i) pour chacun des ARN cibles à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN cible, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN cibles synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,

(ii) la transcription inverse d'un ou plusieurs ARN de gènes de ménage à quantifier, puis l'amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN de gènes de ménage, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN de gène de ménage synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,

(iii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i) et (ii),

(iv) déduction d'une part de la quantité de l'ARN ou des ARN cibles dans l'échantillon et d'autre part de la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage dans l'échantillon, et

(v) Normalisation de la quantité de l'ARN ou des ARN cibles par rapport à la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage

Dans le procédé ci-dessus, le couple d'amorces pour chacun des ARN à quantifier est de préférence choisi de façon à respecter les critères suivants :

- les amorces sont le plus proche possible mais ne se chevauchent pas. Elles permettent l'amplification d'un fragment de taille inférieure ou égale à 200 paires de bases, de préférence inférieure ou égale à 150 paires de base, de manière encore préférée inférieure ou égale à 100 paires de bases,
- le contenu en nucléotides G et C des amorces est compris entre 20 et 80%,
- il est préférable d'éviter la répétition de nucléotides. En particulier, les amorces ne contiennent pas de répétition de plus de trois guanines consécutives,
- la température de fusion des amorces est comprise entre 58 et 60°C, en utilisant comme référence pour le calcul des températures de fusion le logiciel Primer Express ;

- les 5 nucléotides à l'extrémité 3' des amorces ne devraient pas comporter plus de 2 bases G et/ou C.

Les procédés de l'invention peuvent être mis en œuvre pour quantifier n'importe quel type d'ARN dans un échantillon, qu'il s'agisse d'ARN viraux, d'ARN 16S ou d'ARN messagers codant pour des protéines virales, bactériennes, végétales, etc. Par « ARN déterminé », on entend un ARN dont la séquence est suffisamment bien connue pour qu'il soit possible de concevoir des amorces spécifiques de cet ARN, notamment des amorces qui respectent les critères énoncés ci-dessus.

Dans une mise en œuvre particulière, le procédé de l'invention permet la quantification des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon biologique, et comprend les étapes suivantes :

- (i) pour chacun des ARN messagers à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique dudit ARN messenger, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,
- (ii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i), et
- (iii) déduction de la quantité d'ARN messenger de chacune des cytokines dans l'échantillon.

Afin d'obtenir des résultats représentatifs du nombre de cellules à partir duquel a été faite l'extraction d'ARN ayant subi la RT-PCR, l'étape (i) peut également impliquer, à partir de l'échantillon biologique, la transcription inverse, puis l'amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique d'un ou plusieurs ARN messagers de gènes de ménage.

Le choix d'un tel gène de ménage nécessite une validation très précise et il est préférable de combiner plusieurs gènes de ménage pour obtenir une quantification absolue fiable.

Ainsi, le procédé de l'invention permet la quantification absolue des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- (i) pour chacun des ARN messagers de cytokines à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN messager, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN cibles synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,
- (ii) la transcription inverse d'un ou plusieurs ARN de gènes de ménage à quantifier, puis l'amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN de gènes de ménage, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN de gène de ménage synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,
- (iii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i) et (ii)
- (iv) déduction d'une part de la quantité de l'ARN ou des ARN messagers de cytokines dans l'échantillon et d'autre part de la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage dans l'échantillon, et
- (v) Normalisation de la quantité de l'ARN ou des ARN messagers de cytokines par rapport à la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage.

Dans les expériences décrites ci-dessous, la β 2-microglobuline (β 2-MG) a été choisie pour les travaux sur les cellules du sang, et l'expression de ce gène est quantifiée par la même méthode que l'est celle du gène

cible. Les résultats sont ainsi exprimés en nombre de copies d'ARNm du gène cible pour 1 million de copies d'ARNm de β 2-microglobuline.

Les inventeurs ont également développé les gènes de l'ubiquitine C (UBC) et de la YWHAZ dont l'expression est décrite comme étant très stable (Vandesompele et al.). D'autres gènes de ménage peuvent bien évidemment être utilisés dans le cadre de l'invention.

Alternativement, et toujours dans l'optique de quantifier le nombre de cellules à partir duquel s'est faite la réaction, il est possible d'effectuer un comptage des cellules avant extraction de l'ARN. Toutefois, ceci n'est pas toujours possible et souvent imprécis, et il peut également exister un biais au niveau de l'extraction de l'ARN, tout l'ARN des cellules comptées n'étant pas nécessairement extrait.

Une autre possibilité serait donc d'exprimer les résultats en fonction de la quantité d'ARN total rétro-transcrit. Cependant, pour un même nombre de cellules, cette quantité peut varier en fonction de la phase du cycle cellulaire où se trouvent les cellules et en fonction de l'état d'activation des cellules ce qui pose un problème pour la comparaison entre un patient et un contrôle sain qui n'ont certainement pas le même statut d'activation cellulaire.

Dans le procédé de l'invention, l'amplification du produit de la transcription inverse peut être réalisée par n'importe quelle technique d'amplification d'acide nucléique utilisée en biologie moléculaire, telle que la PCR (polymerase chain reaction), la TMA (transcription mediated amplification), la NASBA (nucleic acid sequence based amplification), la 3SR (self sustained sequence replication), l'amplification par déplacement de brin ou SDA (strand displacement amplification) et la LCR (ligase chain reaction). La PCR sera néanmoins préférentiellement utilisée pour cette amplification.

La quantification d'ARN différents peut être réalisée dans différents puits ou dans un même puits. Dans le cas d'une quantification de plusieurs ARN dans un même puits, l'intercalant fluorescent sera remplacé

par des marqueurs permettant des lectures distinctes de chaque amplification. On pourra pour ce faire utiliser les techniques du type multiplex.

L'utilisation d'une gamme d'ARN de référence, en permettant de
5 prendre en compte le rendement de la phase de RT, permet donc une quantification absolue de l'ARN messenger considéré initialement présent dans l'échantillon biologique.

Dans une mise en oeuvre préférée du procédé selon l'invention,
une gamme d'ARN synthétique est donc constituée pour chaque ARN
10 messenger à quantifier. Cette gamme est par exemple constituée d'une série de dilutions d'un ARN transcrit à partir d'une cassette d'ADN comprenant le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en 5' et en 3' de la séquence de l'amplicon amplifié à partir de l'ARN messenger, par le couple d'amorces spécifique dudit ARN messenger. Cette cassette d'ADN
15 peut être en outre flanquée de sites de restriction par une endonucléase, par exemple de sites de restriction EcoRI. Ceci peut permettre de cloner les constructions obtenues dans des vecteurs plasmidiques avec lesquels il est possible de transformer des bactéries, afin d'assurer le maintien et la conservation de ces constructions à long terme.

Un autre objectif de la présente invention est de permettre une
20 automatisation facile de la quantification des cytokines d'intérêt. Pour cela, les inventeurs ont développé des couples d'amorces qui permettent de mettre en oeuvre le procédé ci-dessus dans des conditions identiques pour tous les ARN messagers à quantifier. Un procédé selon l'invention, dans
25 lequel l'étape de transcription inverse puis d'amplification est effectuée par RT-PCR, et dans lequel toutes les réactions de RT-PCR sont réalisées dans les mêmes conditions de température, fait donc partie intégrante de la présente invention. Ceci permet notamment la détection de plusieurs cytokines sur une même plaque et la comparaison absolue des ARN
30 codant pour plusieurs cytokines.

Comme mentionné plus haut, l'utilisation de sondes fluorescentes pour marquer l'amplicon présente le double inconvénient d'être onéreuse, et de risquer d'introduire un biais éventuel dans la quantification, si les amorces utilisées ne sont pas strictement spécifiques de l'ARN messager à quantifier. Dans les procédés selon l'invention, la
5 détection en temps réel du produit d'amplification sera donc préférentiellement effectuée par mesure de l'incorporation d'un intercalant fluorescent, par exemple du SYBR Green ITM. Bien entendu, tout autre intercalant fluorescent, tel que le BET, le Hoeschst 33258, le SYBR Gold, le
10 YOYO-1, ou le PicoGreen peut être utilisé pour cela.

Le procédé développé n'exclut pas pour autant l'utilisation de sondes ou amorces fluorescentes ou toute autre technique de détection permettant la quantification stricte du produit d'amplification. La détection du produit PCR peut en effet être effectuée au moyen de tout signal
15 susceptible d'être transcrit électroniquement. Des sondes oligonucléotidiques comportant d'autres marqueurs que le SYBR Green I sont, par exemple, décrites dans les brevets de Kayem et al. US 6,479,340 et US 6,495,323.

Les inventeurs ont mis au point un ensemble d'amorces utilisables dans des conditions standard programmées dans un thermocycleur, et dans une mise en œuvre préférée des procédés selon l'invention, les réactions de RT-PCR sont effectuées dans les conditions de thermocyclage suivantes :

- transcription inverse :

- incubation des amorces : 8 à 12 minutes entre 23 et 27°C, de préférence 10 minutes à 25°C ;
- action de la transcriptase inverse : 20 à 80 minutes entre 45 et 51°C, de préférence 30 minutes à 48°C ;
- inactivation de la transcriptase inverse : 4 à 10 minutes
entre 90 et 98°C, de préférence 5 minutes à 95°C ;

- 2 à 7 minutes entre 45 et 55°C, de préférence 5 minutes à 50°C, puis 8 à 12 minutes entre 90 et 98°C, de préférence 10 minutes à 95°C ;
- puis 30 à 45 cycles, de préférence 40 cycles, comprenant :
 - 12 à 20 secondes entre 90 et 98°C, de préférence 15 secondes à 95°C, et
 - 50 à 80 secondes entre 55 et 65°C, de préférence 1 minute à 60°C.

Des conditions de thermocyclage particulières sont les suivantes :

- transcription inverse :
 - incubation des amorces : 10 minutes à 25°C ;
 - action de la transcriptase inverse : 30 minutes à 48°C ;
 - inactivation de la transcriptase inverse : 5 minutes à 95°C ;
- 5 minutes à 50°C, puis 10 minutes à 95°C ;
- puis 40 cycles, comprenant :
 - 15 secondes à 95°C, et
 - 1 minute à 60°C.

Bien entendu, les conditions décrites ci-dessus sont essentiellement indicatives et en aucun cas restrictives.

Les réactions de RT-PCR peuvent également avantageusement être réalisées en une seule étape (*one step RT-PCR*).

Dans les exemples décrits ci-après, toutes les réactions de PCR ont été effectuées en utilisant le SYBR Green PCR master mixTM d'Applied BiosystemsTM, sur une machine ABI PrismTM 7700, dans les conditions de thermocyclage programmées par défaut, à savoir : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles de {15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C}.

Les inventeurs ont mis au point plusieurs couples d'amorces pour des cytokines humaines, ainsi que 3 gènes de ménage, de telle sorte que chaque couple d'amorces présente les caractéristiques suivantes :

- spécificité : les couples d'amorces doivent être strictement spécifiques des ARN messagers à quantifier, ce qui signifie qu'ils ne doivent pas amplifier l'ADN génomique, ni des pseudo-gènes. Pour éviter l'amplification de l'ADN génomique, une technique est de choisir au moins une amorce à la jonction entre deux exons. Le choix d'amorces dans des exons différents, séparés par un intron d'une longueur telle que l'amplification de l'ADN génomique nécessiterait une durée supérieure à la durée de l'élongation, permet également d'éviter l'amplification de l'ADN cellulaire. Pour éviter l'amplification de pseudo-gènes, une mise au point au cas par cas a été nécessaire. Il convient de noter qu'un couple d'amorces peut être spécifique d'un ARN messager même si l'une des amorces de ce couple (ou même les deux) s'hybride aussi avec l'ADN cellulaire et/ou avec des pseudo-gènes. En effet, la spécificité d'un couple est liée à la combinaison des deux amorces. Dès lors qu'une des deux amorces est strictement spécifique de l'ARNm, ou que les deux amorces ne s'hybrident pas à l'ADN cellulaire ou à un pseudo-gène dans des conditions propres à permettre l'amplification exponentielle qui caractérise la PCR, un couple d'amorces sera spécifique de l'ARNm.
- conditions d'utilisation : comme mentionné ci-dessus, les couples d'amorces ont été générés de façon à être tous utilisables dans les mêmes conditions, et particulièrement dans les mêmes conditions de thermocyclage. Ceci implique notamment qu'ils aient une température de fusion (T_m) de l'ordre de 58-60°C, et qu'ils permettent l'amplification d'une séquence d'une taille comprise entre 50 et 200 nucléotides, de préférence entre 75 et 150 nucléotides.

L'exemple 2 ci-dessous décrit la façon dont les amorces ont été mises au point. Les couples d'amorces sont décrits dans le tableau 1 suivant :

Gène	Numéro d'accension	Amorce directe (5' -> 3')	SEQ ID No	Amorce inverse (5' -> 3')	SEQ ID No	Taille de l'amplicon
IL-1 β	XM_010760	CCTGTCCCTGCGCTGTTGAAAGA	1	GGGAACTGGCAGACTCAAA	2	149
IL-10	AY029171	GCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCT	3	CTTGATGCTCTGGGCTCTTGTTCT	4	108
IL-12p40	AF180563	CATGGTGGATGCCGTTCA	5	ACCTCCACCTGCCGAGAAT	6	131
IL-13	NM_002188	ACAGCCCTCAGGGAGCTCAT	7	TCAGGTTGATGCTCCATACCAT	8	96
IL-15	U14407	CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTT	9	CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA	10	115
IL-18	E17135	CCTGTCCCTGCGCTGTTGAAAGA	11	GGGAACTGGCAGACTCAAA	12	105
IFN- γ	NM_000619	GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA	13	AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC	14	112
MIF	M25639	GCCCCGACAGGGTCTACA	15	CTTAGGCCGAAGGTGGAGTTGTT	16	77
TGF- β 1	NM_000660	CAAGGGCTACCATGCCAACT	17	AGGGCCAGGACCTTGCTG	18	83
TNF- α	XM_041847	CCCCAGGACCTCTCTCTAATC	19	GTTTGTCTACAACATGGGCTACA	20	97
IL-4	NM_000589	AACAGCCTCACAGAGCAGAAGAC	21	GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT	22	101
β 2-MG	NM_004048	AATTGAAAAAGTGGAGCATTTCAGA	23	GGCTGTGACAAAAGTCACATGGTT	24	134
YWHAZ	NM_003406	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	25	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	26	93
Ubiquitine C	M26880	ATTTGGGTGCGGGTTCTTG	27	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	28	132

Tableau 1

Dans une variante de réalisation des procédés de l'invention, pour la quantification d'ARN messagers de cytokines humaines, au moins deux des couples d'amorces sont choisis de façon à ce que la séquence des amorces hybridant avec l'ARN messenger considéré présente au moins 85% ou 90% d'identité avec des couples d'amorces cités dans le tableau 1, considérés comme couples de référence pour chaque ARNm considéré.

On considèrera ici, pour un couple d'amorces, que la séquence hybridant avec l'ARN messenger considéré présente au moins 85 % d'identité avec un couple donné si, pour chacune des amorces, la partie de cette amorce hybridant avec ledit ARN messenger a au moins 85 % d'identité avec une des deux amorces du couple de référence décrit dans la présente demande pour ledit ARN messenger. Bien entendu, une identité de 90% est calculée selon le même principe. Plusieurs logiciels existent pour calculer le pourcentage d'identité entre deux séquences, au nombre desquels figure le logiciel BLAST™, qui peut être utilisé ici. En particulier, la version 2.06 peut être utilisée, de même que la version standard d'alignement de nucléotides disponible sur le site de la NCBI ou, pour les séquences entre 7 et 20 nucléotides, la version spécifique pour les séquences courtes, disponible sur ce même site (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Les séquences similaires ainsi envisagées peuvent être de la même longueur que les séquences explicitement décrites dans le présent texte, ou d'une longueur différente, alors comprise de préférence entre 15 et 35 bases. En particulier, des amorces différant des amorces décrites par une modification à leur extrémité 5' (par exemple un ajout de nucléotides non complémentaires de la séquence d'ARN messenger), mais qui conservent les caractéristiques de spécificité et de conditions d'utilisation décrites ci-dessus, peuvent être facilement utilisées en lieu et place des amorces spécifiques mises au point par les inventeurs. Par abus de langage, et pour une plus grande clarté du présent texte, il sera dit d'un couple d'amorces dont la séquence hybridant avec l'ARN messenger considéré présente au moins 85 % d'identité avec un couple décrit dans la présente demande, qu'il présente au moins 85 %

d'identité avec ledit couple d'amorces, même si cette identité n'est calculée que pour la partie de chaque amorce qui est susceptible de s'hybrider avec l'ARN messager.

Dans les procédés de l'invention, il est également possible de
5 contrôler l'efficacité de la phase d'extraction de l'ARN à partir de l'échantillon biologique. Pour cela, une quantité connue d'ARN hétérologue est introduite dans l'échantillon avant l'extraction. Par "ARN hétérologue", on entend ici n'importe quel ARN qui comprend une séquence amplifiable par RT-PCR avec des amorces qui ne permettent pas l'amplification d'une séquence
10 identique à partir de l'échantillon biologique. Il peut s'agir d'un ARN provenant d'une espèce différente, par exemple de bactéries ou de levure lorsque l'échantillon provient d'un animal, ou d'un ARN synthétique. Cet ARN hétérologue est alors quantifié après RT-PCR (ou réaction équivalente), ce qui permet de contrôler la phase d'extraction.

Egalement dans l'objectif de contrôler le rendement de l'extraction,
15 il est possible d'introduire dans l'échantillon biologique à analyser un nombre connu de cellules hétérologues. Le taux d'expression de l'ARN d'un gène de ménage (ou autre) de ces cellules est alors quantifié après extraction. Bien entendu, ce gène est choisi de façon telle qu'il comprend une séquence
20 amplifiable par RT-PCR avec des amorces qui ne permettent pas l'amplification d'une séquence identique à partir de l'échantillon biologique. Le rapport entre le nombre de copies d'ARN messager de ce gène des cellules hétérologues et le nombre de cellules hétérologues introduites dans l'échantillon permet d'évaluer le rendement de l'extraction.

L'invention porte également sur un ensemble de couples
25 d'amorces nucléotidiques destinées en particulier à être utilisées dans les procédés de l'invention, pour quantifier des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon biologique, et dans lequel au moins deux couples d'amorces, de préférence trois, sont choisis parmi, ou
30 présentent un degré d'identité d'au moins 85% ou 90% avec les couples d'amorces du tableau 1.

Un autre objet de l'invention est une trousse de détection de désordres liés à la régulation des lymphocytes Th1/Th2, comprenant un ensemble de couples d'amorces tel que décrit ci-dessus, caractérisée en ce que les couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-10, l'IL-13, le TGF- β , le TNF- α , et l'IFN- γ . Le cas échéant, une telle trousse peut également contenir un ou plusieurs couples d'amorces spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, et le TNF- β .

La présente invention porte également sur une trousse de détection de désordres inflammatoires ou de désordres de l'immunité innée, comprenant un ensemble de couples d'amorces tel que décrit plus haut, dans lequel les couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IFN- γ , le TNF- α , le TGF- β , l'IL-1- β , l'IL-12p35, l'IL-12p40, l'IL-15 et l'IL-18. Une telle trousse peut également comprendre en outre un ou plusieurs couples d'amorces spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IFN- α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-21, l'IFN- β , l'iNOS et l'IL-16.

Deux autres trousse, destinées à quantifier les ARN messagers des cytokines reliées à l'IL-10, ou reliées à l'IL-12, font également partie de l'invention. La première comprend un ensemble de couples d'amorces telles que décrites ci-dessus, dans lequel un couple d'amorces est spécifique de l'ARN messager de l'IL-10, un ou plusieurs couples d'amorces sont spécifiques de gènes de ménage choisis parmi les gènes de β 2-microglobuline humaine, l'ubiquitine C et le gène YWMAZ, et d'autres couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22 et l'IL-24. La deuxième, dédiée aux cytokines reliées à l'IL-12, comprend un ensemble de couples d'amorces telles que décrites ci-dessus, dans lequel un couple d'amorces est spécifique de l'ARN messager de l'IL12p40, un ou plusieurs couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de gènes de ménage choisis parmi les gènes de β 2-microglobuline humaine, l'ubiquitine C et le gène YWMAZ, et d'autres

couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-12p35, l'IL-23, l'IL-27 et l'AK155.

Un des buts des trousse de détection selon la présente invention est d'être utilisables en clinique pour évaluer l'état du système immunitaire d'un patient, sans nécessiter la mise au point des conditions de réalisation de la RT-PCR pour chaque ARN messenger recherché, en vue d'obtenir directement une quantification absolue des ARN messagers de cytokines impliquées dans les désordres mentionnés ci-dessus.

Cette quantification absolue peut être obtenue grâce à l'utilisation de gammes d'ARN standard. Une trousse selon l'invention, telle que décrite plus haut, et comprenant en outre, pour chaque couple d'amorces spécifique d'un ARN messenger, un ARN synthétique comprenant la séquence dudit ARN messenger qui est amplifiée par le couple d'amorces, fait donc également partie de la présente invention.

Les trousse de l'invention comporteront en outre avantageusement une notice explicative destinée à l'utilisateur.

Dans l'hypothèse où le rendement de la phase RT pourrait être maîtrisé, une gamme d'ADN comprenant la séquence de l'ADN complémentaire qui est amplifiée par le couple d'amorces pourrait également être utilisée. Alternativement, l'utilisateur des trousse selon la présente invention peut produire une gamme d'ARN standard à partir d'une matrice ADN. L'invention porte donc également sur une trousse telle que décrite plus haut, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, pour chaque couple d'amorces spécifique d'un ARN messenger, un ADN synthétique comprenant la séquence de l'ADN complémentaire qui est amplifiée par le couple d'amorces.

Dans les trousse de l'invention comportant un ARN ou un ADN synthétique destiné à constituer une gamme de référence, cet acide nucléique synthétique peut être présent soit directement sous la forme d'une gamme d'ARN standard, soit sous la forme d'une solution mère de

concentration déterminée, à partir de laquelle l'utilisateur effectuera des dilutions, soit sous la forme d'ARN précipité et séché, par exemple lyophilisé.

La solution mère de la gamme standard (ADN ou ARN) peut être également présente sous forme d'acide nucléique en solution dans l'éthanol ou l'isopropanol. L'utilisateur devra alors centrifuger cette solution afin de culoter l'acide nucléique avant de resuspendre le culot dans un tampon adéquat (type eau + inhibiteurs de Rnases ou eau traitée au DEPC), et de déterminer par lecture de la densité optique la concentration de la solution obtenue. Celle-ci sera alors ramenée à la concentration correspondant au premier point de la gamme standard.

Comme mentionné ci-dessus, l'ARN synthétique peut être obtenu par transcription *in vitro* à partir d'une cassette d'ADN comprenant le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en 5' et en 3' de la séquence à amplifier.

Une autre trousse selon l'invention peut donc contenir une construction ADN servant de matrice de transcription pour l'obtention de l'ARN standard et, le cas échéant, les réactifs nécessaires à la transcription *in vitro* de cette matrice. Comme mentionné ci-dessus, l'utilisateur devra, après transcription et purification, quantifier l'ARN synthétique afin de générer la gamme d'ARN standard. Une notice comportant des instructions à cet effet pourra être incluse dans la trousse en question.

Les troussees selon l'invention peuvent également comporter un ARN hétérologue ou des cellules hétérologues par rapport aux échantillons biologiques avec lesquels elles sont destinées à être utilisées, ainsi qu'un couple d'amorces spécifiques d'une séquence comprise dans cet ARN ou dans l'ARN de ces cellules. Lors de l'utilisation de ces troussees, une quantité de l'ARN hétérologue ou de cellules hétérologues sera mélangée avec chaque échantillon biologique à traiter, avant l'extraction de l'ARN, afin de contrôler l'efficacité de la phase d'extraction, comme mentionné plus haut. Une telle trousse comporte donc de préférence des amorces spécifiques de cet ARN hétérologue ou d'une séquence d'ARN de ces cellules

hétérologues. Un protocole de contrôle de cette efficacité peut alors être décrit dans la notice explicative éventuellement présente dans la trousse.

L'ADN synthétique peut être obtenu par PCR en utilisant soit les amorces spécifiques de l'ARN considéré, soit une version modifiée de ces amorces (ajout de sites de restriction, ...). L'amplicon obtenu peut être cloné dans un vecteur plasmidique (soit à l'aide des sites de restriction, soit en utilisant des kits de clonage de produits PCR type TA cloning kit® de InVitrogen®). Ceci permet non seulement une meilleure conservation de la construction, mais aussi une meilleure détermination des concentrations de solutions standard, car pour un nombre identique d'amplicons, la valeur de densité optique sera plus élevée, puisqu'elle prendra en compte les nucléotides composant le vecteur.

Une trousse selon l'invention peut également comprendre un logiciel de traitement des données, capable de compiler les résultats obtenus à partir des gammes standard, des gènes de ménages, et de l'échantillon biologique, et de donner directement la quantité d'ARN messager de chaque cytokine testée dans l'échantillon biologique. Ce logiciel peut être porté par tout support, y compris une disquette ou une carte directement implantable sur le thermocycleur utilisé. Le cas échéant, il peut être réduit à une macro dans Microsoft Excel® ou d'autres tableurs, pour automatiser les principales étapes du traitement de données.

Selon un mode de réalisation préféré des ensembles de couples d'amorces, ou des trousse de l'invention, ces ensembles ou trousse comprennent des couples d'amorces spécifiques des ARN messagers d'au moins trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix ou onze cytokines.

Suivant un autre aspect de l'invention, les ensembles de couples d'amorces ou trousse décrits plus haut comprennent de préférence des couples d'amorces spécifiques des ARN messagers d'au moins un, deux, trois ou quatre gènes de ménage. Ces gènes de ménage peuvent par exemple être choisi parmi les gènes de β -actine (ACTB), β -2-microglobuline (B2M), glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase (GAPD), hydroxyméthyl-

bilane synthase (HMBS), hypoxanthine phosphoribosyl-transférase I (HPRT I), la protéine ribosomale LI3a (RPLI3A), la sous-unité A du complexe succinate dehydrogénase (SDHA), la protéine de liaison à la TATA box (TBP), l'ubiquitine C (UBC), et le peptide zeta de la protéine d'activation de la tyrosine-3-monooxygénase / tryptophane 5 monooxygénase (YWHAZ). Des exemples d'amorces utilisables pour amplifier des séquences de ces gènes de ménages sont donnés dans l'article de Vandesompele, De Preter et al. 2002. Les exemples et figures présentés ci-dessous à titre non limitatif permettront de mettre en évidence certains avantages et caractéristiques de la présente invention.

Légende des figures

Figure 1 : Schéma du protocole de RT-PCR quantitative en temps réel utilisant une gamme d'ARN standards recombinants.

Figure 2 : Construction d'une gamme d'ARN standard. Le couple d'amorce spécifique génère un amplicon qui sert de matrice à une seconde PCR utilisant les amorces spécifiques modifiées par la fusion en 5' de la séquence du promoteur T7 suivie d'un site de restriction EcoRI. Le produit de PCR est purifié avant d'être utilisé comme matrice de transcription in vitro. L'ARN standard produit est purifié, quantifié afin de réaliser une gamme d'ARN standard. Cette gamme subira une RT-PCR et servira de référence pour la quantification absolue du nombre de copies de l'ARNm considéré.

Figure 3 : Protocole de comparaison des approches gamme ARN versus gamme ADN.

Voie I : après transcription inverse, un ADNc du standard ARN est dilué en série d'un facteur 10 afin de générer une gamme d'ADNc. Voie II : l'ARN standard est dilué en série d'un facteur 10 et chaque point subit une RT-PCR. Voie III : une gamme d'ADN de séquence correspondant à celle de l'ARN standard est amplifiée par PCR. Cette voie est celle classiquement

utilisée pour la quantification des ARNm. Les conditions de PCR en temps réel sont identiques pour les 3 voies (même mix PCR, même plaque). Les efficacités d'amplification correspondantes sont calculées à partir des pentes des droites standards. L'efficacité de transcription inverse est égale au rapport entre EII et EI. Efficacité de PCR (EI) Efficacité de RT-PCR (EII) Efficacité de PCR (EIII)

Figure 4 : Validation des amorces. La spécificité des couples d'amorces utilisés est validée par analyse sur gel d'agarose (A) et par séquençage. Les courbes de dissociation (B) renseignent également sur la formation de dimères d'amorces. Enfin, les amorces sélectionnées sont utilisées en RT-PCR temps réel pour amplifier une gamme d'ARN standard spécifique dudit couple d'amorces (exemple de la $\beta 2$ -globuline : C).

Figure 5 : Courbes de dissociation des produits d'amplification humains pour la $\beta 2$ -microglobuline, le MIF, l'IFN- γ , IL-1 β , l'IL-15, l'IL-12p40, l'IL-10, le TNF, l'IL-13, l'IL-18 et le TGF- β -1. Après 40 cycles d'amplification, les amplicons sont soumis à une montée progressive en température de 60 à 85°C. Une diminution brutale de la fluorescence accompagne la dissociation des deux brins d'ADN du produit d'amplification lorsque ceux-ci atteignent leur température de fusion. La spécificité des amorces utilisées est validée par la présence d'un pic unique.

Figure 6 : Courbes de dissociation des produits d'amplification humains pour l'ubiquitine C (A.) et la YWHAZ (B.). La spécificité des amorces utilisées est validée par la présence d'un pic unique.

Figure 7 : Courbes de dissociation des produits d'amplification simiens pour la $\beta 2$ -microglobuline, le MIF, l'IL-12p40, l'IL-10, l'IL-15 (A.) et l'IFN- γ , la GAPDH et le TNF- α (B.). La spécificité des amorces utilisées est validée par la présence d'un pic unique.

Figure 8 : Détermination des concentrations d'amorces optimales pour le TNF- α . Les amorces sens et antisens ont été utilisées à 50, 300 ou 900 nM final pour amplifier les transcrits du TNF- α par RT-PCR en temps réel.

5 **Figure 9** : Détermination de la sensibilité de la technique. L'ARN total issu d'un nombre décroissant de cellules a été soumis à une RT-PCR pour le gène de la β 2-microglobuline. Parallèlement, une gamme d'ARN standard de ce même gène a subi les mêmes étapes. Ainsi, il a été déterminé que la technique de la présente invention permettait l'extraction et l'amplification de
10 l'ARN d'au moins 10 cellules. L'amélioration du rendement de la phase d'extraction de l'ARN est en cours et devrait permettre d'augmenter cette sensibilité.

Figure 10 : Sensibilité des gammes ARN. Une gamme de nombre de copies
15 d'ARN standard de chaque transcrit a été rétro-transcrite puis amplifiée par PCR en temps réel afin de déterminer le nombre minimum de copies amplifiable. Pour les transcrits de l'IL-1 β , notre technique permet la détection de 10 copies d'ARNm.

20 **Figure 11** : Reproductibilité intra-expérimentale de la technique pour les gènes de la β 2-microglobuline et de l'IL-1 β . Quatre gammes identiques d'ARN standard ont été rétro-transcrites et soumises à une amplification par PCR. Les panneaux A. et B. montrent la moyenne des cycles seuils et l'écart à cette moyenne pour chacun des points. Une des gammes a servi de base
25 pour la détermination du nombre de copies présentes dans les 3 autres gammes. Les graphiques C. et D. représentent la moyenne de ces valeurs calculées et l'écart type à cette moyenne pour chacun des points en fonction du nombre de copies théoriques.

30 **Figure 12** : Reproductibilité intra-expérimentale de la technique pour les gènes de l'IL-15 et de l'IL-18. Quatre gammes identiques d'ARN standard ont

été rétro-transcrites et soumises à une amplification par PCR. Les panneaux A. et B. montrent la moyenne des cycles seuils et l'écart à cette moyenne pour chacun des points. Une des gammes a servi de base pour la détermination du nombre de copies présentes dans les 3 autres gammes. Les graphiques C. et D. représentent la moyenne de ces valeurs calculées et l'écart type à cette moyenne pour chacun des points en fonction du nombre de copies théoriques.

Figure 13 : Reproductibilité intra-expérimentale de la technique pour les gènes de l'IFN- γ et du TGF- β 1. Quatre gammes identiques d'ARN standard ont été rétro-transcrites et soumises à une amplification par PCR. Les panneaux A. et B. montrent la moyenne des cycles seuils et l'écart à cette moyenne pour chacun des points. Une des gammes a servi de base pour la détermination du nombre de copies présentes dans les 3 autres gammes. Les graphiques C. et D. représentent la moyenne de ces valeurs calculées et l'écart type à cette moyenne pour chacun des points en fonction du nombre de copies théoriques.

Figure 14 : Reproductibilité intra-expérimentale de la technique pour les gènes de l'ubiquitine C et de la YWHAZ. Quatre gammes identiques d'ARN standard ont été rétro-transcrites et soumises à une amplification par PCR. Les panneaux A. et B. montrent la moyenne des cycles seuils et l'écart à cette moyenne pour chacun des points. Une des gammes a servi de base pour la détermination du nombre de copies présentes dans les 3 autres gammes. Les graphiques C. et D. représentent la moyenne de ces valeurs calculées et l'écart type à cette moyenne pour chacun des points en fonction du nombre de copies théoriques.

Figure 15 : Reproductibilité inter-expérimentale de la technique pour les gènes de la β 2-microglobuline et du TGF- β 1. Huit gammes différentes d'ARN standard ont été rétro-transcrites et soumises à une amplification par PCR à

des jours différents. Les panneaux A. et B. montrent la moyenne des cycles seuils et l'écart à cette moyenne pour chacun des points de gamme. Les graphiques C. et D. représentent la moyenne des valeurs calculées et l'écart type à cette moyenne pour chacun des points en fonction du nombre de copies théoriques.

Figure 16 : Comparaison des efficacités de RT-PCR entre une gamme standard et un échantillon cellulaire. Une gamme d'ARN standard pour la $\beta 2$ -microglobuline allant de 10 à 10^8 copies a été amplifiée par RT-PCR. La pente de la droite standard résultante (A.) est égale à $-3,305$. Cette pente est très proche de celle issue de la droite standard B. correspondant à une gamme de densité cellulaire allant de 10 à 10^5 cellules dont l'ARN total a subi les mêmes conditions de RT-PCR que la gamme standard pour l'amplification des ARNm de la $\beta 2$ -microglobuline ($= -3,307$).

Figure 17 : Comparaison des efficacités et des sensibilités entre la méthode de l'invention et le kit TaqMan™ pour l'amplification des transcrits du TNF- α . Une gamme d'ARN cellulaire total a été rétro-transcrite puis amplifiée par PCR en temps réel en utilisant soit la méthode de l'invention soit le kit commercial TaqMan™. Les droites standard obtenues permettent de déterminer l'efficacité et les sensibilités des deux techniques. Dans les conditions testées, la méthode de l'invention est aussi sensible et plus efficace que TaqMan™ considérée comme technique de référence.

Figure 18 : Cinétiques de transcription et de sécrétion du MIF (A.) et du TNF- α (B.)

A. Cinétiques de transcription et de sécrétion du MIF par des cellules mononucléées du sang périphérique issues d'un donneur sain après 3, 6 et 9 heures de culture en présence de LPS (10 ng/mL), de SAC ($0,0075\%$), de globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* au stade trophozoïtes ($20:1$) ou de globules rouges sains ($20:1$). Cette cytokine étant pour partie

préformée, il n'existe pas de relation directe entre les taux de transcrits et les taux de protéines secrétées. La sécrétion du MIF est mesurée dans les surnageants de culture par ELISA (R&D™).

B. Cinétiques de transcription et de sécrétion du TNF- α par des cellules mononucléées du sang périphérique issues d'un donneur sain après 3, 9 et 18 heures de culture en présence de LPS (10 ng/mL), de SAC (0,0075%), de globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* au stade trophozoïtes (20:1) ou de globules rouges sains (20:1). Cette cytokine n'étant pas stockée dans la cellule, la transcription de l'ARNm précède de quelques heures la sécrétion mesurée dans les surnageants de culture par ELISA (BioSource). Il y a donc corrélation entre l'activité transcriptionnelle et la sécrétion de la protéine correspondante.

Figure 19 : Transcription des gènes de différentes cytokines par des monocytes isolés de donneurs sains. Les monocytes isolés ont été incubés pendant 0.5, 1, 2, 3, 6 ou 9 heures en présence de LPS (100 ng/mL) ou de SAC (0,0075%). Les transcrits de cytokines sont quantifiés puis normalisés pour un million de copies d'ARN de β 2- μ globuline. Les histogrammes représentent le rapport entre le nombre de copies d'ARN cibles et d'ARNm de la β 2-microglobuline (moyenne de 2 donneurs).

Figure 20 : Capacité de transcription du TGF- β 1 chez des sujets contrôles ou des patients souffrant de paludisme.

Des PBMC d'individus contrôles (Asymptomatic Controls) ou de patients souffrant de paludisme (Malaria patients) ont été prélevés et stimulés pendant 22 heures par du LPS (100 ng/mL). L'ARN total de ces PBMC a été extrait afin de quantifier le nombre de transcrits TGF- β 1. Les histogrammes représentent le nombre de copies d'ARNm de TGF- β 1 pour un million de copies d'ARNm de β 2-microglobuline. *: différence statistiquement significative ($p < 0,05$)

Figure 21 : Développement des conditions pour la quantification de l'ARNm de l'IL-4. La spécificité des amorces choisies est validée par la présence d'un pic unique sur la courbe de dissociation (A.) et par séquençage du produit. Une gamme de concentration d'ARN standard est amplifiée par RT-PCR pour valider son utilisation pour la quantification des ARNm de l'IL-4 (B.). Celle-ci est réalisée sur des PBMC de 2 donneurs sains (D16 et D18) stimulées par du LPS, du SAC ou des globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* pendant 0.5, 1, 2, 3, 6 ou 9 heures (C.).

EXEMPLES

Pour tous les exemples qui suivent, les matériels et méthodes décrits ci-après ont été utilisés :

Stimulation des cellules

Des cellules humaines mononucléées de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains ont été isolées en utilisant du Ficoll™ 1.077 (Nycomed™),

Un million de cellules vivantes ont été distribuées dans des plaques de culture à 48 puits à fond plat (Costar™), et stimulées avec du LPS (10 ng/ml, *E. coli* 0111 : B7, Sigma™), PHA-L (10 µg/ml, Sigma™), SAC (0,0075%, Pansorbin Cells™), des schizontes vivants de *P. falciparum* (parasitémie finale de 1%, souche FCR3) ou des globules rouges O+ intacts et non infectés.

Les cellules ont été récoltées pour l'extraction de l'ARN après 3, 6, 9, 12, 18, 24 et 48 heures de stimulation, puis resuspendues dans du tampon RNA PLUS (Q-Biogene™, 500 µl pour 10⁶ cellules).

Extraction d'ARN et transcription inverse

L'ARN cellulaire total a été extrait en utilisant le kit RNA-PLUS® de chez Q-Biogene®, en suivant les instructions du fournisseur et resuspendu dans de l'eau dépourvu de RNase (Ambion™). La quantité d'ARN total a été déterminée par densité optique à 260 nm. L'ADN complémentaire a été

obtenu en utilisant les réactifs "TaqManTM Reverse Transcription Reagents" (Applied BiosystemsTM) dans un volume réactionnel de 50 µl.

Amplification de l'ADN complémentaire

Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (ACP ou *polymerase chain reaction, PCR*) quantitative en temps réel a été effectuée sur un thermocycleur ABI Prism 7700TM en utilisant le tampon SYBR-Green PCR master mixTM (Applied BiosystemsTM) dans un volume final de 30 µl. Les conditions de thermocyclage étaient les conditions par défaut : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 10 minutes et 40 cycles de {95°C pendant 15 secondes puis 60°C pendant 1 minute}. Chaque point a été dupliqué. Les amorces utilisées pour chaque amplification (chacune à 900 nM finale) sont décrites dans le Tableau 1.

Construction de standards ARN externes

Des amorces modifiées ont été utilisées sur l'ADNc cellulaire pour construire la matrice de transcription. Ces amorces étaient les amorces spécifiques des gènes considérés, fusionnées à leur extrémité 5' à la séquence du promoteur T7. Chaque matrice a ensuite été purifiée sur colonne de silice (NucleospinTM, Macherey-NagelTM) avant d'être transcrite *in vitro* en utilisant le kit MegaShort Script Transcription KitTM (AmbionTM). Les concentrations des ARN standard ont été calculées par densité optique à 260 nm. Des dilutions en série ont été réalisées pour chaque standard externe, dans une plage allant de 10 copies par µL à 10¹² copies par µL, dans de l'eau dépourvue de RNase. Ces dilutions ont été aliquotées et stockées à -80°C. Ces standards ont ensuite subi la même transcription inverse que l'ARN cellulaire.

Analyse quantitative

Les courbes de standards externes et la quantification ont été obtenues en utilisant le logiciel SDS 1.9. À partir de ces courbes standard, la quantité initiale des ARN messagers cibles a été déterminée pour chacun

des échantillons, et standardisée pour la β 2-microglobuline. Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARN messenger par million de copies d'ARN messenger de β 2-microglobuline.

Test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés en suivant les instructions du fournisseur (TNF-alpha: BioSource et MIF: R&D).

Exemple 1 : Courbe standard d'ARN

1.1 : génération de la courbe standard

La technique d'ACP emboîtée (*Nested-PCR*) a été utilisée pour flanquer chaque amplicon spécifique d'une séquence promotrice de la polymérase T7. Cette construction a été utilisée pour générer un ARN standard qui a été chargé sur un gel et soumis à une migration pour vérifier sa clonalité (résultats non montrés). Le poids moléculaire de chacun des standards a été calculé sur la base de sa séquence attendue, puis des solutions allant de 10^1 à 10^{12} copies d'ARN standard par microlitre ont été faites.

Ces solutions diluées en série ont été soumises à une transcription inverse, et l'ADN a été amplifié en doublant chaque point, pour générer une courbe standard, en pointant le cycle seuil (C_T) en regard de la valeur logarithmique du nombre de copies d'ARN de départ pour chaque dilution. La figure 2 montre un exemple de ces courbes pour IFN- γ . Chaque courbe générée a montré une efficacité de RT-PCR supérieure à 84% et une gamme dynamique d'au moins 7 ordres de grandeur. Ceci a permis une quantification fiable et reproductible d'un ARNm d'un échantillon cellulaire.

1.2 : Comparaison entre des courbes d'ARN et d'ADN standard

Afin de comparer les résultats générés par l'utilisation d'une gamme d'ARN standard à ceux issus de l'utilisation d'une gamme d'ADN standard, l'expérience suivante a été réalisée.

Les matrices ADN servant de base à la transcription des ARN standard de l'IL-1 β , de l'IFN- γ et du TNF- α ont été purifiées et quantifiées par D.O. afin de réaliser des gammes de concentrations allant de 10 copies à 10¹² copies/ μ L.

On disposait donc de deux types de gammes dans lesquelles les deux constructions ont quasiment la même séquence.

Les gammes d'ARN standard ont été soumises à une étape de transcription reverse et 5 μ L du produit de RT ont été amplifiés par PCR en temps réel.

Parallèlement, un échantillon d'ARN standard a été rétro-transcrit, et l'ADNc correspondant a fait l'objet de dilutions en série d'un facteur dix. Une gamme d'ADNc a donc ainsi été générée et soumise à amplification (même mix, même volume final que les gammes d'ARN et d'ADN).

Le protocole est schématisé à la figure 3.

Les droites standard résultant de ces trois gammes ont les caractéristiques indiquées dans le tableau 1 ci-dessous:

D'après la théorie de la PCR, le nombre de copies entre deux cycles augmente d'un facteur X qui est égal à 2 si la PCR est efficace à 100 %.

L'efficacité E d'une PCR est donnée par $E = X - 1$, or $X = 10^{-1/\text{pente}}$.

Ainsi, on a les efficacités indiquées ci-dessous.

	RNA standard				VOIE III : DNA standard		
	Voie I : PCR		Voie II : RT-PCR				
	Pente	efficacité	Pente	efficacité	pente	efficacité	Efficacité de RT (II/I)
IL-1β	-3,1966	1,05	-3,4794	0,94	-3,067	1,11	0,84
IFN-γ	-3,1161	1,09	-3,843	0,82	-2,944	1,19	0,76
TNF-α	-3,556	0,91	-3,61	0,89	-3,503	0,93	0,97

Tableau 2 : Influence des approches gamme ARN versus gamme ADN sur la quantification des transcrits. Les données de pente et d'efficacité pour les

trois types de gamme sont données. Les efficacités de transcription inverse (RT) sont calculées par le rapport entre l'efficacité de RT-PCR (voie II) et celle de PCR (voie I).

Il apparaît donc que les efficacités des RT-PCR sont inférieures à celles des PCR pour les 3 gènes.

Ceci est dû à la phase de RT puisque les efficacités des PCR sur ADNc et ADN sont similaires pour chaque gène.

Les efficacités des PCR sur ADNc étant semblables à celles des PCR sur ADN, la différence d'efficacité entre la RT-PCR et la PCR est attribuable à la phase de RT qui n'a pas une efficacité de 100% contrairement à ce qui est avancé par la plupart des auteurs pour justifier l'emploi d'une gamme ADN pour la quantification d'ARNm.

Ceci est un premier biais à prendre en compte pour quantifier de façon fiable le taux de transcrits. Cependant, si ce biais était constant, la comparaison entre les expériences serait possible.

L'expérience montre que, l'efficacité de la phase de RT diffère selon les ARN

Le biais de quantification apporté par la phase de RT existe donc et varie. Ceci ne peut donc en aucun cas permettre l'utilisation de gammes d'ADN pour la quantification fiable, reproductible et précise des ARN messagers.

En effet, si on compare les données obtenues en se basant sur les droites standard issues des gammes ADN ou ARN pour quantifier un nombre connu de transcrits de TNF- α on obtient les résultats suivants :

	Nb de copies initial réel	Nb de copies initial calculé par la voie II (RNA)	Nb de copies initial calculé par la voie III (ADN)
Expérience 1	5.10^7	$5,2.10^7$	$7,7.10^5$
Expérience 2	5.10^7	$4,9.10^7$	$5,7.10^5$

Tableau 3 : Influence des approches gamme ARN versus gamme ADN sur la quantification des transcrits

En se basant sur une gamme d'ADN, on sous-estime donc fortement le nombre de transcrits présents dans l'échantillon. De plus, le degré de sous-estimation varie selon les transcrits étudiés.

L'ensemble de ces données justifie l'emploi d'une gamme d'ARN standard pour la quantification fiable et reproductible de transcrits et démontre le manque d'exactitude et l'inutilité de l'utilisation d'une gamme d'ADN.

Exemple 2 : Amorces

Exemple 2.1 : Validation des amorces

Des paires d'amorces ont été dessinées à partir des séquences génomiques publiées en utilisant le logiciel *Primer Express*TM (*Applied Biosystems*TM), en respectant au mieux les critères suivants :

- Choisir des amorces les plus proches possible l'une de l'autre à condition qu'elles ne se chevauchent pas
- Garder le contenu en GC entre 20 et 80%
- Éviter la répétition de nucléotides. Ceci est particulièrement vrai pour la guanine pour laquelle une suite de 4 guanines ou plus devrait être évitée.
- Choisir des amorces dont la température de fusion se situe entre 58 et 60°C quand on utilise le logiciel *Primer Express*TM.
- Les 5 nucléotides à l'extrémité 3' ne devraient pas comporter plus de 2 bases G et/ou C.

La spécificité des amorces pour les ADNc cibles a été assurée en dessinant des amorces directes et inverses amplifiant un produit couvrant un intron et qui ne conduit pas à l'amplification de pseudo-gènes ou d'autres gènes reliés. La spécificité a été estimée par une analyse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, par des courbes de dissociation (Fig. 4 à 7) et

par séquençage des produits d'amplification par PCR (résultats non montrés).

Chaque amplicon a été cloné dans un vecteur pCR2.1 en utilisant le kit d'Invitrogen™ (*TA cloning kit*™), et séquencé. Les séquences
5 présentaient toutes au moins 98% d'identité avec la séquence attendue (résultats non montrés).

Exemple 2.2 : Optimisation de la concentration des amorces

Il s'agit de tester l'effet d'une variation de la concentration en amorces sur la quantité de copies d'ARN détectées. Pour ce faire, les
10 concentrations d'amorces sens et anti-sens variaient de 50 à 900 nM. Les concentrations des amorces ont été optimisées pour déterminer les concentrations d'amorces minimum donnant le cycle de seuil (*threshold cycle*, C_T) le plus bas (et donc la plus grande sensibilité) et le ratio signal/bruit maximum en fluorescence (ΔR_n), tout en minimisant les
15 amplifications non-spécifiques (résultats non montrés).

La figure 8 présente les résultats obtenus pour la détection du TNF- α . Pour ce gène comme pour tous les autres, le couple de concentration optimale est de 900nM pour l'amorce sens et anti-sens.

20 *Exemple 3 : Détermination de la sensibilité de la technique : Taille minimale de l'échantillon et nombre de copies minimal*

Afin de déterminer la sensibilité de la technique, une gamme de densité cellulaire allant de 10^5 cellules à 1 cellule a été réalisée. L'ARN total de ces cellules a été extrait et rétro-transcrit. Un dixième de l'ADNc obtenu a
25 subi une amplification par PCR pour le gène de la β 2-microglobuline. En parallèle, une gamme d'ARN standard de ce même gène a subi les mêmes étapes de RT-PCR. Les résultats de cette expérience sont présentés en figure 9. Ils montrent que cette technique permet de détecter de façon fiable les transcrits du gène de la β 2-microglobuline dans 10 cellules au minimum.
30 Il est à noter qu'il ne s'agit pas ici d'une dilution d'ARN correspondant à un

«équivalent cellule» de 10 mais bien d'ARN extrait directement de 10 cellules. Si on raisonne en dilution d'ARN standard, la sensibilité est de 10 copies.

Il a également été établi, pour chacun des gènes développés, la sensibilité de la technique en termes de nombre de copies détectables. Celle-ci varie selon les cytokines entre 10 et 100 copies (Figure 10)

Exemple 4 : Variabilités intra et inter expérimentales

La reproductibilité de la technique a été étudiée. La variabilité intra expérimentale a été calculée à partir de points de gamme d'ARN standard en quadruplicate pour les gènes de la β 2-microglobuline, ubiquitine C, YWHAZ, IL-1 β , IL-15, IL-18, IFN-gamma et TGF- β 1. La moyenne des cycles seuils pour chaque point ainsi que les écarts types à cette moyenne ont été calculés et sont représentés sur les figures 11, 12, 13 et 14 (A et B). De même, une des gammes a servi de standard pour calculer les quantités d'ARN standard pour les 3 autres points. La moyenne des quantités obtenues ainsi que les écarts types à cette moyenne sont montrés en figures 11, 12, 13 et 14 (C et D).

La variabilité inter expérimentale a été déterminée pour les gènes de la β 2-microglobuline et du TGF- β 1 à partir de 8 expériences indépendantes réalisées à plusieurs jours d'intervalle et en utilisant des lots différents de mix PCR. La même stratégie que pour la variabilité intra expérimentale a été utilisée et les résultats sont présentés sur la figure 15.

Ces résultats montrent que la technique de la présente invention est très reproductible, aussi bien au niveau intra expérimental qu'au niveau interexpérimental. Ceci est un atout majeur pour la fiabilité et la comparaison des résultats obtenus pour différents échantillons traités à différents moments.

Exemple 5 : Comparaison des efficacités de RT-PCR entre la gamme et l'échantillon

Comme à l'exemple 4, l'efficacité de RT-PCR varie d'un gène à l'autre et selon les expériences pour un même gène.

Il est donc possible que cette variation entraîne un biais dans la quantification si elle se produit entre la gamme et les échantillons.

Les efficacités de RT-PCR entre une gamme de $\beta 2$ -microglobuline et des ARN cellulaires extraits de 10, 100, 1000, 10 000 ou 100 000 cellules ont donc été comparées.

Ainsi, les ARN standard et cellulaires composent chacun une gamme de concentration en ARN dont les points sont espacés d'un facteur 10.

Ces deux populations d'ARN ont subi en parallèle les mêmes conditions de RT-PCR pour l'amplification des ARNm de la $\beta 2$ -microglobuline.

Les résultats sont présentés à la figure 16.

Ils montrent que les pentes des droites standards sont quasiment identiques et que donc les efficacités de RT-PCR sont très proches entre la gamme standard et l'échantillon cellulaire (100,7% et 100,6% respectivement).

Ainsi, la variabilité de l'efficacité de RT-PCR n'introduit pas de biais dans la quantification des ARNm dans les conditions utilisées dans cette expérience. Les résultats obtenus par cette technique sont donc fiables.

Exemple 6 : Comparaison des efficacités de RT-PCR entre la méthode de l'invention et le kit TaqMan™

La méthode de l'invention a été comparée à la technique Taqman™, technique de référence dans ce domaine, pour le gène du TNF- α . Des monocytes ont été stimulés pendant 6 heures avec du LPS. L'ARN total a été extrait de 10^6 cellules et dilué en série. Cette gamme d'ARN

cellulaire total a été amplifiée pour l'ARNm du gène TNF- α , en parallèle, sur une même plaque et dans les mêmes conditions de thermocyclage en utilisant soit la méthode de l'invention soit la chimie Taqman™ (Applied-Biosystem).

Les résultats de ce test sont montrés figure 7. Aux dilutions étudiées, il apparaît que la méthode de l'invention est aussi sensible que la technique de référence Taqman™. De plus, la présente méthode montre une efficacité légèrement supérieure à celle de la technique Taqman™: 105% versus 80% correspondant respectivement à des pentes de -3,2 (technique de l'invention) et -3,9 (technique Taqman™).

Exemple 7 : Validation des standards internes (gènes de ménage)

Le choix d'un gène endogène exprimé de façon stable, et qui peut être utilisé comme standard interne (gène de ménage) est un pré-requis pour une quantification par RT-PCR précise. Le standard interne est choisi en fonction de l'évaluation clinique du patient et de l'origine tissulaire de l'échantillon biologique. Puisque l'analyse des cytokines nécessite un standard interne pouvant être utilisé sur des leucocytes périphériques sanguins, 3 gènes connus pour la stabilité de leur expression au sein des leucocytes ont été étudiés : la β 2-microglobuline (β 2-MG), l'ubiquitine C (UBC) et le gène YWHAZ. La stabilité de la quantité de transcrits de ces 3 gènes a été comparée par la méthode de l'invention, dans différentes conditions d'activation.

Des PBMC de donneurs sains ont été stimulés pendant 3 heures par du PBS ou du PHA (phytohaemagglutinin) puis séparés en deux aliquots identiques. Les ARN cellulaires totaux ont été extraits à deux jours d'intervalle puis le même volume d'ARN a été retro-transcrits, et les transcrits des 3 gènes amplifiés par RT-PCR, dans les mêmes conditions. Le tableau 4 suivant montre les résultats obtenus : moyenne obtenue et entre parenthèse les résultats des deux extractions. Ces données montrent que la β 2-

microglobuline donnent des résultats reproductibles, avec moins de 12% de variabilité entre les différentes expériences, alors que les résultats concernant les gènes ubiquitine C et YWHAZ montrent une variabilité pouvant atteindre 47%. La β 2-microglobuline a donc été choisi comme standard interne pour les futures expériences de quantification absolue.

	T0 (non-stimulé)	LPS 3h	PHA 3h
β2-MG	1,24.10 ⁷ (1,00.10 ⁷ -1,49.10 ⁷)	1,48.10 ⁷ (1,17.10 ⁷ -1,79.10 ⁷)	1,37.10 ⁷ (1,11.10 ⁷ -1,64.10 ⁷)
UBC	2,04.10 ⁵ (0,62.10 ⁵ -3,46.10 ⁵)	2,39.10 ⁵ (1,51.10 ⁵ -3,28.10 ⁵)	1,98.10 ⁵ (1,33.10 ⁵ -2,64.10 ⁵)
YWHAZ	1,89.10 ⁵ (0,78.10 ⁵ -3,01.10 ⁵)	2,80.10 ⁵ (2,25.10 ⁵ -3,34.10 ⁵)	3,36.10 ⁵ (2,60.10 ⁵ -4,13.10 ⁵)

Tableau 4 : Choix du standard interne. Pour chaque gène testé, apparaissent sur la première ligne la moyenne des deux extractions, et sur la seconde ligne, le résultat individuel des deux extractions. Les tests ont été réalisés sans stimulation (T0) ou après une stimulation de 3 heures avec du LPS ou du PHA.

Exemple 8 : Cinétique de transcription des facteurs MIF et TNF- α

La figure 18 représente les cinétiques de transcription et de production du MIF (A.) et du TNF- α (B.) par des PBMC d'un donneur sain stimulés par le LPS, le SAC, des globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* ou des globules rouges sains pendant 3, 9 et 18 heures.

Les résultats montrent une augmentation de la transcription de TNF- α environ 3 heures après stimulation, transcription qui précède la sécrétion de la protéine TNF- α (B.). En revanche, le gène MIF est fortement transcrit et ce de façon constitutive à l'état basal (T0), et ni la stimulation par du LPS, ni par du SAC n'augmente cette transcription.

Ceci démontre que la méthode de l'invention est validée sur des échantillons stimulés *in vitro*. De plus, elle souligne la complémentarité de l'approche du dosage des ARN et des protéines pour des cytokines

néoformées (TNF- α) en comparaison de cytokines préformées (MIF). Enfin, ces résultats confirment les données de la littérature qui rapportent que MIF est présent dans les cellules à la fois sous forme de protéines préformées prêtes à être sécrétées, et sous forme d'ARNm qui peuvent être rapidement traduits en absence de toute transcription.

Exemple 9 : Cinétique de transcription des gènes de différentes cytokines

Des expériences de stimulation *in vitro* par du LPS et du SAC ont été menées sur les sous-populations monocytaires et lymphocytaires, isolées du sang, pendant 0,5, 1, 2, 3, 6 et 9 heures. L'extraction des ARN correspondants a été réalisée et la quantification des ARN messagers codant pour les cytokines IL-1 β , IL-15, IL-4, IL-18, IL-10, MIF, IL-12p40, TGF- β 1, IL-13 et TNF- α a été réalisée et rapportée à la quantité d'ARNm codant pour la beta-2 microglobuline, choisi comme gène de ménage (standard interne).

La figure 19 présente le résultat obtenu avec les monocytes purifiés d'un des donneurs. Aucune augmentation significative de la quantité d'ARNm d'IL-15, d'IL-18, de MIF ou de TGF- β 1 n'a été détectée. Concernant l'IL-1 β et l'IL-10, les deux stimulants induisent une cinétique comparable d'accumulation de transcrits. En revanche, on observe une accumulation de transcrits d'IL-4 et d'IL-13 précoce en réponse au LPS (2 heures) que l'on ne retrouve pas pour la stimulation par le SAC. Quant à l'IL-12p40, on observe une accumulation de transcrits plus précoce par stimulation avec le LPS qu'avec le SAC. Enfin, l'accumulation de transcrits TNF- α est plus prolongée dans le temps après stimulation avec le SAC, comparée à la stimulation avec le LPS.

Exemple 10 : Capacité de transcription du TGF- β 1

Les ARN provenant de cellules mononucléées du sang périphérique de patients souffrant de paludisme ou d'individus contrôles, après stimulation par du LPS, ont été extraits. La quantification des ARNm des gènes de la β 2 microglobuline et du TGF- β 1 a été réalisée. La figure 20 présente la

différence de capacité de transcription du TGF- β 1 entre des patients atteints de paludisme et des individus contrôles.

Les cellules de patients atteints de paludisme montrent une transcription de TGF- β 1 supérieure à ceux de sujets contrôles, après stimulation par le PBS ($p=0,036$; différence statistiquement significative *).

Exemple 11 : Cinétique de quantification de l'ARNm de l'IL-4

Des amorces pour l'IL-4 ont été dessinées et les conditions d'amplification de l'IL-4 validées. La figure 21 présente la courbe de dissociation des amorces sélectionnées (A.), ainsi que la droite montrant l'efficacité de l'amplification (B.). De façon à valider cette cytokine, des ARN messagers codant pour l'IL-4 à partir de PBMC dérivés de 2 donneurs sains (Donneurs 16 et 18) ont été quantifiés, après stimulation de ces PBMC, entre une demi-heure et 9 heures, avec du LPS (100 ng/ml), du SAC (0,0075%) ou des globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* à la concentration de 20 parasites pour un leucocyte. La cinétique d'expression de l'IL-4 apparaît comparable pour les deux donneurs (C.)

BIBLIOGRAPHIE

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.

5 Ginzinger, D. G. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." Exp Hematol **30**(6): 503-12.

10 Giulietti, A., L. Overbergh, et al. (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." Methods **25**(4): 386-401.

Stordeur, P., L. F. Poulin, et al. (2002). "Cytokine mRNA quantification by real-time PCR." J Immunol Methods **259**(1-2): 55-64.

15 Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de quantification absolue d'un ou de plusieurs ARN cibles dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

5 (i) pour chacun des ARN cibles à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN cible, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN cibles synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,

10

(ii) la transcription inverse d'un ou plusieurs ARN de gènes de ménage à quantifier, puis l'amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN de gènes de ménage, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une
15 gamme d'ARN de gène de ménage synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,

(iii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i) et (ii),

20

(iv) déduction d'une part de la quantité de l'ARN ou des ARN cibles dans l'échantillon et d'autre part de la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage dans l'échantillon, et

25

(v) Normalisation de la quantité de l'ARN ou des ARN cibles par rapport à la quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le couple d'amorces est choisi de façon à respecter les critères suivants :

- les amorces ne se chevauchent pas et permettent l'amplification d'un fragment de taille inférieure ou égale à 200 paires de bases, de préférence inférieure ou égale à 150 paires de base, de manière encore préférée inférieure ou égale à 100 paires de bases,
 - le contenu en nucléotides G et C des amorces est compris entre 20 et 80%,
 - les amorces ne contiennent pas de répétition de plus de trois guanines consécutives,
 - la température de fusion des amorces est comprise entre 58 et 60°C,
 - les 5 nucléotides à l'extrémité 3' des amorces comportent au maximum 2 bases G et/ou C.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'ARN déterminé est un ARN viral, un ARN 16S ou un ARN messager.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour la quantification absolue des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :
- (i) pour chacun des ARN messagers de cytokines à quantifier, transcription inverse, puis amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN messager, à partir de l'échantillon biologique, et à partir d'une gamme d'ARN cibles synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,
 - (ii) la transcription inverse d'un ou plusieurs ARN de gènes de ménage à quantifier, puis l'amplification du produit de cette transcription inverse, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique de chaque ARN de gènes de ménage, à partir de l'échantillon

biologique, et à partir d'une gamme d'ARN de gène de ménage synthétique comprenant la séquence amplifiée par le couple d'amorces spécifique,

5 (iii) détection en temps réel du produit des réactions d'amplification de l'étape (i) et (ii),

(iv) déduction d'une part de la quantité de l'ARN ou des ARN messagers de cytokines dans l'échantillon et d'autre part de la
10 quantité de l'ARN ou des ARN de gènes de ménage dans l'échantillon, et

(v) Normalisation de la quantité de l'ARN ou des ARN messagers de cytokines par rapport à la quantité de l'ARN ou des ARN de
15 gènes de ménage.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel pour chaque ARN messenger à quantifier, la gamme d'ARN synthétique est constituée d'une série de dilutions d'un ARN transcrit à partir d'une cassette d'ADN
20 comprenant le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en 5' et en 3' de la séquence de l'amplicon amplifié à partir de l'ARN messenger, par le couple d'amorces spécifique dudit ARN messenger.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel
25 les étapes (i) et (ii) sont effectuées par RT-PCR, toutes les réactions de RT-PCR étant réalisées dans les mêmes conditions de température.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la détection en temps réel du produit d'amplification est effectuée par
30 mesure d'un signal susceptible d'être transcrit électroniquement, de préférence par mesure de l'incorporation d'un intercalant fluorescent, et

de manière encore préférée par mesure de l'incorporation de SYBR Green I.

- 5 8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, dans lequel la RT-PCR est effectuée en une seule étape.
- 10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel l'étape (i) est précédée d'une étape d'introduction d'une quantité connue d'ARN hétérologue ou de cellules hétérologues dans l'échantillon biologique et d'une étape d'extraction de l'ARN de l'échantillon biologique, et dans lequel ledit ARN hétérologue ou l'ARN desdites cellules hétérologues fait l'objet, à l'étape (i), d'une transcription inverse suivie d'une amplification du produit de cette transcription inverse.
- 15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, dans lequel les réactions de RT-PCR sont effectuées dans les conditions de thermocyclage suivantes :
- transcription inverse :
 - incubation des amorces : 8 à 12 minutes entre 23 et 27°C, de préférence 10 minutes à 25°C ;
 - action de la transcriptase inverse : 20 à 80 minutes entre 45 et 51°C, de préférence 30 minutes à 48°C ;
 - inactivation de la transcriptase inverse : 4 à 10 minutes entre 90 et 98°C, de préférence 5 minutes à 95°C ;
 - 25 - 2 à 7 minutes entre 45 et 55°C, de préférence 5 minutes à 50°C, puis 8 à 12 minutes entre 90 et 98°C, de préférence 10 minutes à 95°C ;
 - puis 30 à 45 cycles, de préférence 40 cycles, comprenant :
 - 12 à 20 secondes entre 90 et 98°C, de préférence 15
 - 30 secondes à 95°C, et

- 50 à 80 secondes entre 55 et 65°C, de préférence 1 minute à 60°C.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7 dans lequel les réactions de RT-PCR sont effectuées dans les conditions de thermocyclage suivantes :

- transcription inverse :
 - incubation des amorces : 10 minutes à 25°C ;
 - action de la transcriptase inverse : 30 minutes à 48°C ;
 - inactivation de la transcriptase inverse : 5 minutes à 95°C ;
- 5 minutes à 50°C puis 10 minutes à 95°C ;
- puis 40 cycles, comprenant :
 - 15 secondes à 95°C, et
 - 1 minute à 60°C.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel au moins deux des couples d'amorces sont choisis parmi les suivants ou parmi les couples d'amorces ayant au moins 85% d'identité avec les couples d'amorces suivants :

- couple spécifique de l'IL-1 β humaine :
 - 5'- CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 1) et
 - 5'- GGGAAGTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 2)
- couple spécifique de l'IL-10 humaine :
 - 5'- GCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCT -3' (SEQ ID No : 3) et
 - 5'- CTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCT -3' (SEQ ID No : 4)
- couple spécifique de l'IL-12p40 humaine :
 - 5'- CATGGTGGATGCCGTTCA -3' (SEQ ID No : 5) et
 - 5'- ACCTCCACCTGCCGAGAAT -3' (SEQ ID No : 6)
- couple spécifique de l'IL-13 humaine :
 - 5'- ACAGCCCTCAGGGAGCTCAT -3' (SEQ ID No : 7) et
 - 5'- TCAGGTTGATGCTCCATACCAT -3' (SEQ ID No : 8)

- couple spécifique de l'IL-15 humaine :
5'- CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTT -3' (SEQ ID No : 9) et
5'- CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA - 3' (SEQ ID No : 10)
- couple spécifique de l'IL-18 humaine :
5'- CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 11) et
5'- GGGAACTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 12)
- couple spécifique de l'IFN- γ humain :
5'- GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA -3' (SEQ ID No : 13) et
5'- AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC -3' (SEQ ID No : 14)
- couple spécifique du MIF humain :
5'- GCCCGGACAGGGTCTACA -3' (SEQ ID No : 15) et
5'- CTTAGGCGAAGGTGGAGTTGTT -3' (SEQ ID No : 16)
- couple spécifique du TGF- β 1 humain :
5'- CAAGGGCTACCATGCCAACT -3' (SEQ ID No : 17) et
5'- AGGGCCAGGACCTTGCTG -3' (SEQ ID No : 18)
- couple spécifique du TNF- α humain :
5'- CCCAGGGACCTCTCTAATC -3' (SEQ ID No : 19) et
5'- GGTTTGCTACAACATGGGCTACA -3' (SEQ ID No : 20)
- couple spécifique de l'IL-4 humaine :
5'- AACAGCCTCACAGAGCAGAAGAC -3' (SEQ ID No : 21)
5'- GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT -3' (SEQ ID No : 22)
- couple spécifique de la β 2- μ globuline humaine :
5'-AATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGA-3' (SEQ ID No : 23) et
5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGGTT-3' (SEQ ID No : 24)
- couple spécifique de la séquence YWHAZ humaine :
5'- ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA -3' (SEQ ID No : 25)
5'- CCGCCAGGACAAACCAGTAT -3' (SEQ ID No : 26)
- couple spécifique de l'Ubiquitine C humaine :
5'- ATTTGGGTGCGGGTTCTTG -3' (SEQ ID No : 27)
5'- TGCCTTGACATTCTCGATGGT -3' (SEQ ID No : 28)

13. Ensemble de couples d'amorces nucléotidiques, dans lequel au moins deux couples d'amorces, de préférence trois, sont choisis parmi les couples d'amorces suivants ou parmi les couples d'amorces ayant au moins 85% d'identité avec les couples d'amorces suivants :

- 5 - couple spécifique de l'IL-1 β humaine :
5'- CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 1) et
5'- GGGAACTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 2)
- couple spécifique de l'IL-10 humaine :
5'- GCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCT -3' (SEQ ID No : 3) et
10 5'- CTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCT -3' (SEQ ID No : 4)
- couple spécifique de l'IL-12p40 humaine :
5'- CATGGTGGATGCCGTTCA -3' (SEQ ID No : 5) et
5'- ACCTCCACCTGCCGAGAAT -3' (SEQ ID No : 6)
- couple spécifique de l'IL-13 humaine :
15 5'- ACAGCCCTCAGGGAGCTCAT -3' (SEQ ID No : 7) et
5'- TCAGGTTGATGCTCCATACCAT -3' (SEQ ID No : 8)
- couple spécifique de l'IL-15 humaine :
5'- CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTT -3' (SEQ ID No : 9) et
5'- CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA -3' (SEQ ID No : 10)
- 20 - couple spécifique de l'IL-18 humaine :
5'- CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 11) et
5'- GGGAACTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 12)
- couple spécifique de l'IFN- γ humain :
5'- GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA -3' (SEQ ID No : 13) et
25 5'- AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC -3' (SEQ ID No : 14)
- couple spécifique du MIF humain :
5'- GCCCGGACAGGGTCTACA -3' (SEQ ID No : 15) et
5'- CTTAGGCGAAGGTGGAGTTGTT -3' (SEQ ID No : 16)
- couple spécifique du TGF- β 1 humain :
30 5'- CAAGGGCTACCATGCCAACT -3' (SEQ ID No : 17) et
5'- AGGGCCAGGACCTTGCTG -3' (SEQ ID No : 18)

- couple spécifique du TNF- α humain :

5'-CCCCAGGGACCTCTCTCTAATC -3' (SEQ ID No : 19) et

5'-GGTTTGCTACAACATGGGCTACA -3' (SEQ ID No : 20)

- couple spécifique de l'IL-4 humaine :

5'-AACAGCCTCACAGAGCAGAAGAC -3' (SEQ ID No : 21)

5'-GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT -3' (SEQ ID No : 22)

- couple spécifique de la β 2- μ globuline humaine :

5'-AATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGA-3' (SEQ ID No : 23) et

5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGGTT-3' (SEQ ID No : 24),

- couple spécifique de la séquence YWHAZ humaine :

5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA -3' (SEQ ID No : 25)

5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT -3' (SEQ ID No : 26)

- couple spécifique de l'Ubiquitine C humaine :

5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTTG -3' (SEQ ID No : 27)

5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT -3' (SEQ ID No : 28)

lesdits au moins deux couples d'amorces étant utilisables dans des conditions telles que définies à la revendication 10 ou 11 pour quantifier des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon biologique.

14. Ensemble de couples d'amorces nucléotidiques, dans lequel au moins deux couples d'amorces, de préférence trois, sont choisis parmi les couples d'amorces suivants ou parmi les couples d'amorces ayant au moins 85% d'identité avec les couples d'amorces suivants :

- couple spécifique de l'IL-1 β humaine :

5'-CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 1) et

5'-GGGAACTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 2)

- couple spécifique de l'IL-10 humaine :

5'-GCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCT -3' (SEQ ID No : 3) et

5'-CTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCT -3' (SEQ ID No : 4)

- couple spécifique de l'IL-12p40 humaine :

- 5'- CATGGTGGATGCCGTTCA -3' (SEQ ID No : 5) et
5'- ACCTCCACCTGCCGAGAAT -3' (SEQ ID No : 6)
- couple spécifique de l'IL-13 humaine :
5'- ACAGCCCTCAGGGAGCTCAT -3' (SEQ ID No : 7) et
5'- TCAGGTTGATGCTCCATACCAT -3' (SEQ ID No : 8)
- couple spécifique de l'IL-15 humaine :
5'- CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTT -3' (SEQ ID No : 9) et
5'- CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA -3' (SEQ ID No : 10)
- couple spécifique de l'IL-18 humaine :
5'- CCTGTCCTGCGCTGTTGAAAGA -3' (SEQ ID No : 11) et
5'- GGGAAGTGGGCAGACTCAAA -3' (SEQ ID No : 12)
- couple spécifique de l'IFN- γ humain :
5'- GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA -3' (SEQ ID No : 13) et
5'- AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC -3' (SEQ ID No : 14)
- couple spécifique du MIF humain :
5'- GCCCGGACAGGGTCTACA -3' (SEQ ID No : 15) et
5'- CTTAGGCGAAGGTGGAGTTGTT -3' (SEQ ID No : 16)
- couple spécifique du TGF- β 1 humain :
5'- CAAGGGCTACCATGCCAACT -3' (SEQ ID No : 17) et
5'- AGGGCCAGGACCTTGCTG -3' (SEQ ID No : 18)
- couple spécifique du TNF- α humain :
5'- CCCAGGGACCTCTCTCTAATC -3' (SEQ ID No : 19) et
5'- GGTTTGCTACAACATGGGCTACA -3' (SEQ ID No : 20)
- couple spécifique de l'IL-4 humaine :
5'- AACAGCCTCACAGAGCAGAAGAC -3' (SEQ ID No : 21)
5'- GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT -3' (SEQ ID No : 22)
- couple spécifique de la β 2- μ globuline humaine :
5'-AATTGAAAAAGTGGAGCATTTCAGA-3' (SEQ ID No : 23) et
5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGGTT-3' (SEQ ID No : 24),
- couple spécifique de la séquence YWHAZ humaine :
5'- ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA -3' (SEQ ID No : 25)

5'- CCGCCAGGACAAACCAGTAT -3' (SEQ ID No : 26)

- couple spécifique de l'Ubiquitine C humaine :

5'- ATTTGGGTCGCGGTTCTTG -3' (SEQ ID No : 27)

5'- TGCCTTGACATTCTCGATGGT -3' (SEQ ID No : 28)

5 lesdits au moins deux couples d'amorces étant utilisables dans
un procédé, tel que défini dans les revendications 4 à 11, pour quantifier
des ARN messagers d'une ou plusieurs cytokines dans un échantillon
biologique.

10 15. Trousse de détection de désordres liés à la régulation des lymphocytes
Th1/Th2, comprenant un ensemble de couples d'amorces selon la
revendication 13 ou 14, dans lequel les couples d'amorces sont
spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-10, l'IL-
13, le TGF- β , le TNF- α , et l'IFN- γ .

15 16. Trousse de détection selon la revendication 15, comprenant en outre un
ou plusieurs couples d'amorces spécifiques d'ARN messagers de
cytokines choisies parmi l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, et le TNF- β .

20 17. Trousse de détection de désordres inflammatoires ou de désordres de
l'immunité innée, comprenant un ensemble de couples d'amorces selon
la revendication 13 ou 14, dans lequel les couples d'amorces sont
spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IFN- γ , le
TNF- α , le TGF- β , l'IL-1- β , l'IL-12p40, l'IL-15 et l'IL-18 et un couple
25 d'amorces spécifiques d'ARNm de l'IL-12p35.

30 18. Trousse de détection selon la revendication 17, comprenant en outre un
ou plusieurs couples d'amorces spécifiques d'ARN messagers de
cytokines choisies parmi l'IFN- α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-21, l'IFN- β , l'iNOS et
l'IL-16.

19. Trousse pour l'analyse des niveaux d'expression de cytokines, comprenant un ensemble de couples d'amorces selon la revendication 13 ou 14, dans lequel un couple d'amorces est spécifique de l'ARN messager de l'IL-10, un ou plusieurs couples d'amorces sont spécifiques de gènes de ménage choisis parmi les gènes de β 2-microglobuline humaine, l'ubiquitine C et le gène YWMAZ, et d'autres couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22 et l'IL-24.
20. Trousse pour l'analyse des niveaux d'expression de cytokines, comprenant un ensemble de couples d'amorces selon la revendication 13 ou 14, dans lequel un couple d'amorces est spécifique de l'ARN messager de l'IL-12p40, un ou plusieurs couples d'amorces sont spécifiques de gènes de ménage choisis parmi les gènes de β 2-microglobuline humaine, l'ubiquitine C et le gène YWMAZ, et d'autres couples d'amorces sont spécifiques d'ARN messagers de cytokines choisies parmi l'IL-12p35, l'IL-23, l'IL-27 et l'AK155.
21. Trousse selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, pour chaque couple d'amorces spécifique d'un ARN messager, un ARN synthétique comprenant la séquence dudit ARN messager telle que résultant de l'amplification par le couple d'amorces, sous forme d'une solution, d'une gamme, ou sous forme sèche.
22. Trousse selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, pour chaque couple d'amorces spécifique d'un ARN messager, un ADN synthétique comprenant la séquence de l'ADN complémentaire telle que résultant de l'amplification par le couple d'amorces, sous forme d'une solution, d'une gamme, ou sous forme sèche.

23. Trousse comprenant un ensemble d'amorces selon la revendication 13 ou 14, et un logiciel de traitement des données, capable de traiter les résultats obtenus à l'issue des étapes (i) à (iii) d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 12, et d'en déduire la quantité d'ARN messenger de chaque cytokine testée dans l'échantillon biologique.
24. Ensemble de couples d'amorces selon la revendication 13 ou 14, ou trousse de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 15 à 23, caractérisé en ce qu'il comprend des couples d'amorces spécifiques des ARN messagers d'au moins trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf ou dix cytokines.
25. Ensemble de couples d'amorces ou trousse de diagnostic selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des couples d'amorces spécifiques des ARN messagers d'au moins un, deux, trois ou quatre gènes de ménage.
26. Trousse selon l'une quelconque des revendications 20 à 25, comprenant en outre un ARN utilisable comme ARN hétérologue, ou des cellules utilisables comme cellules hétérologues lors de la mise en œuvre du procédé selon la revendication 10 et, le cas échéant, des amorces spécifiques dudit ARN hétérologue ou d'une séquence d'ARN desdites cellules hétérologues.

1/21

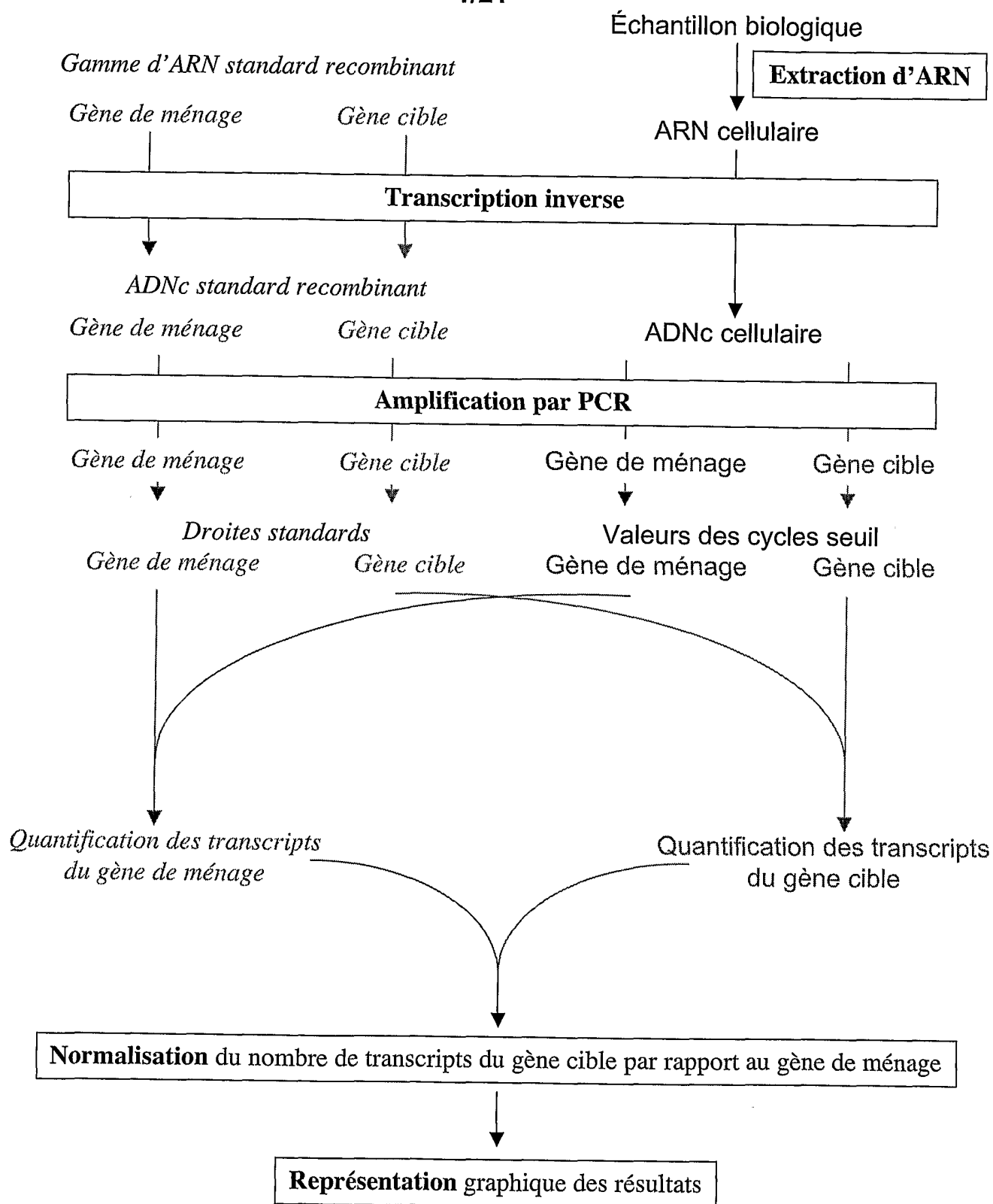
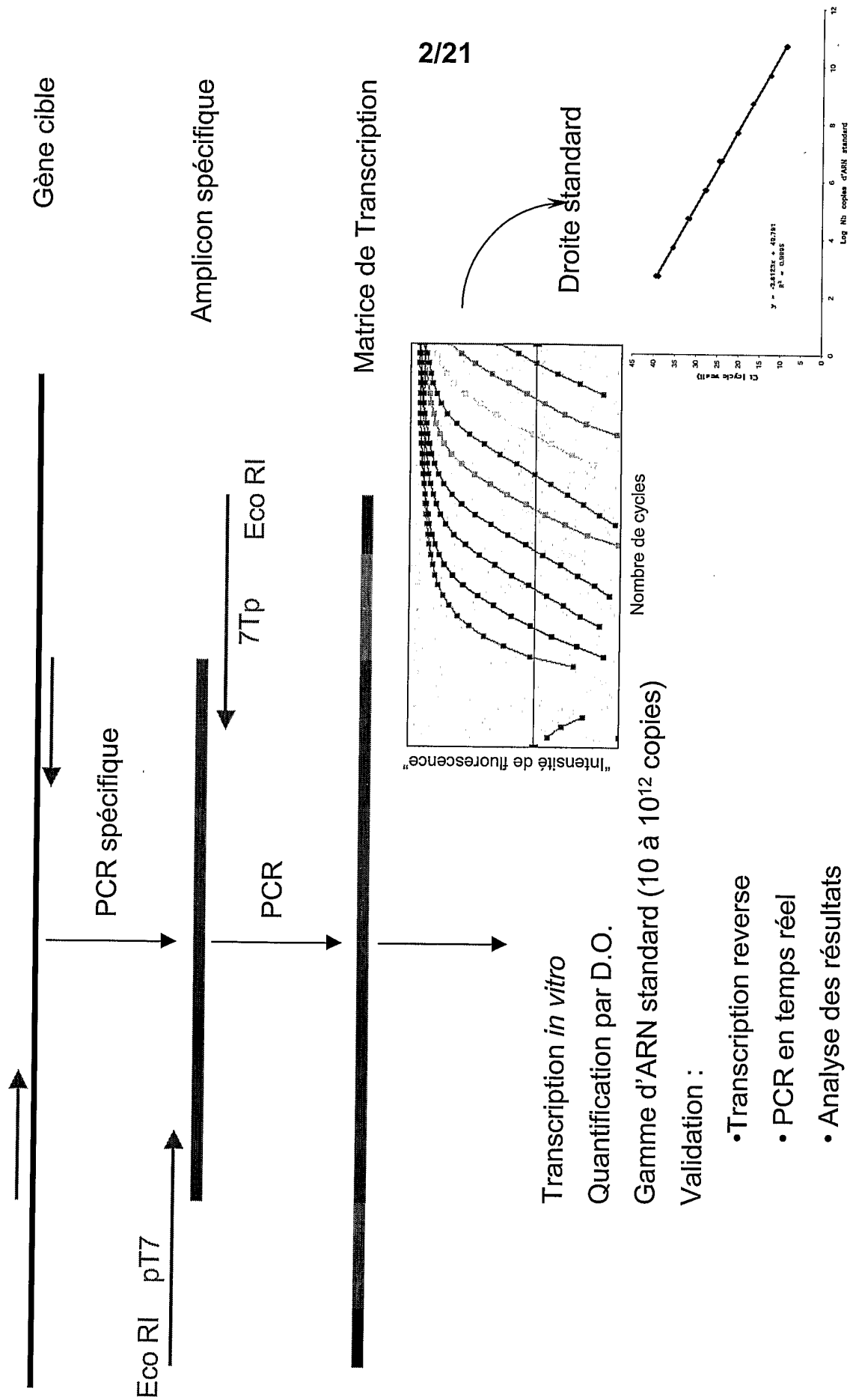
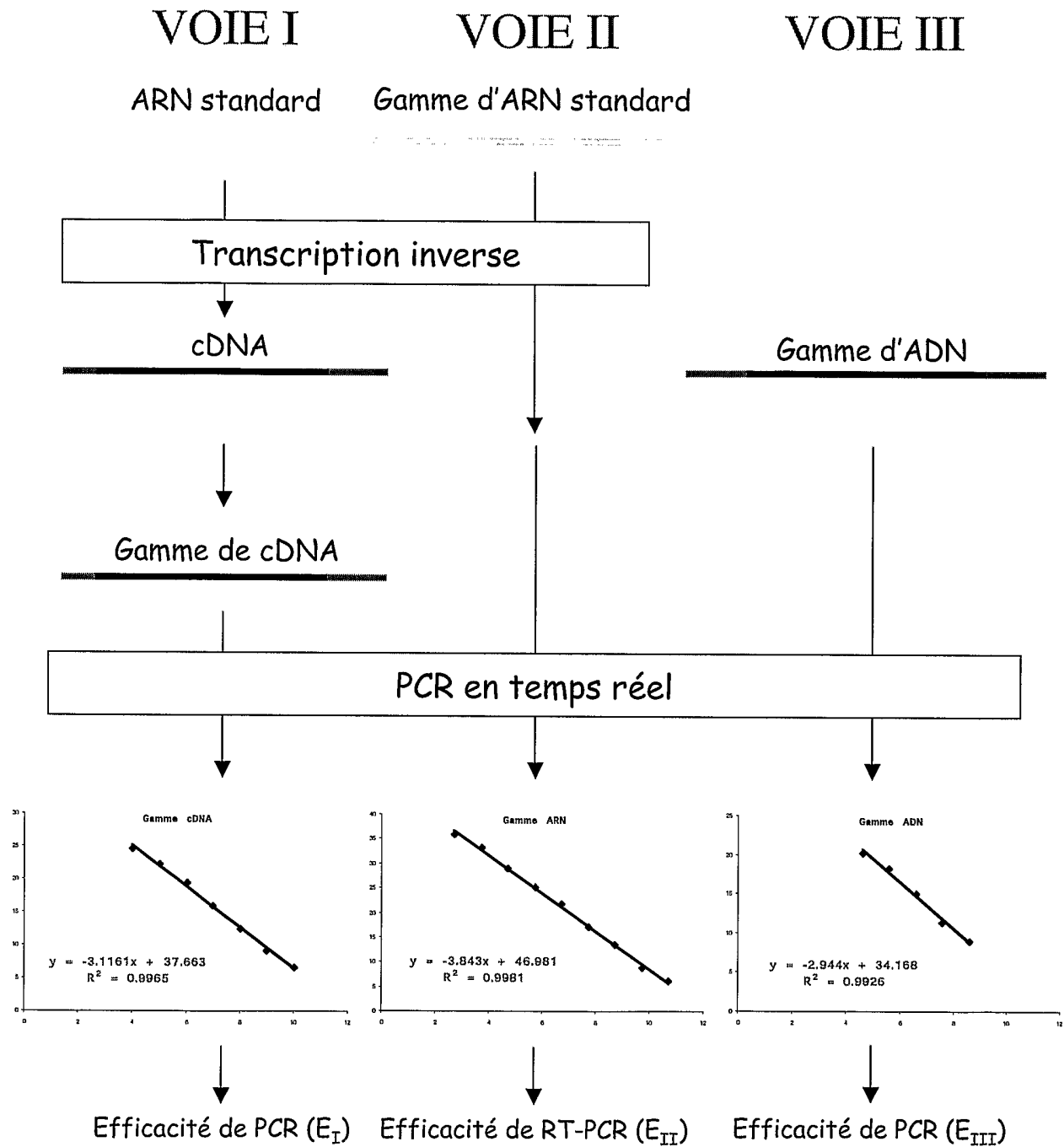


Figure 1



3/21



- Détermination des efficacités d'amplification
- Quantification des transcrits

Figure 3

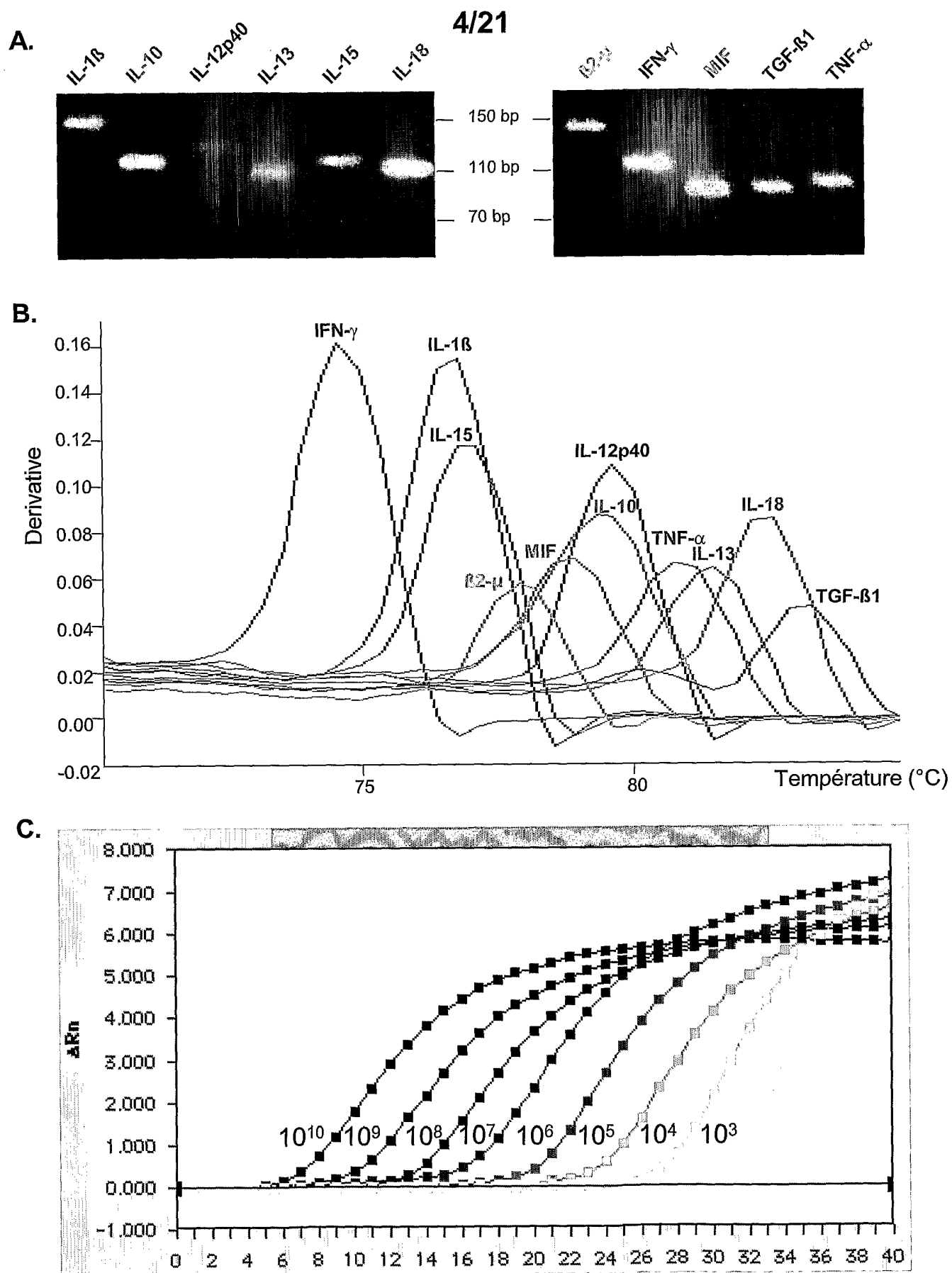


Figure 4

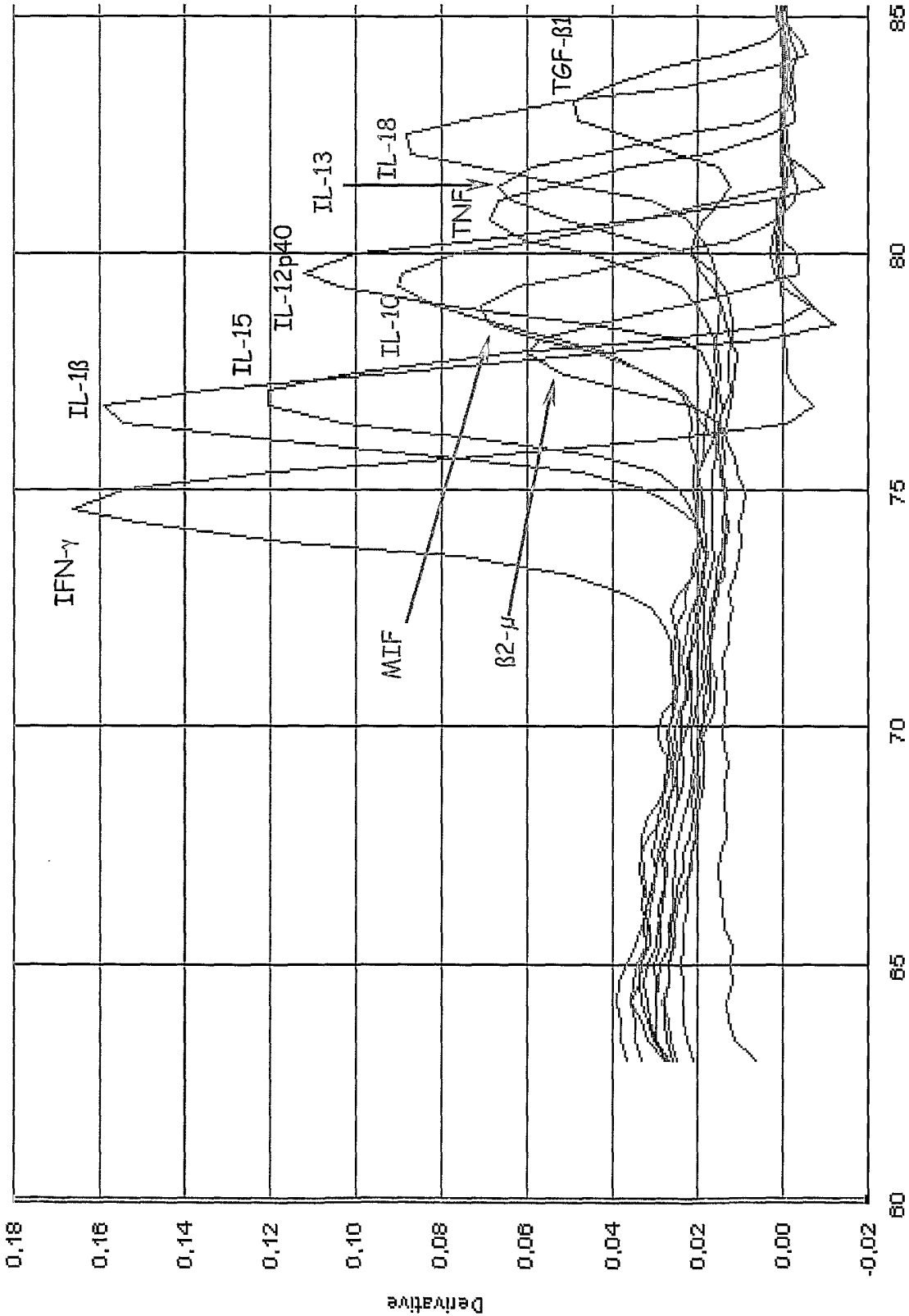


Figure 5

6/21

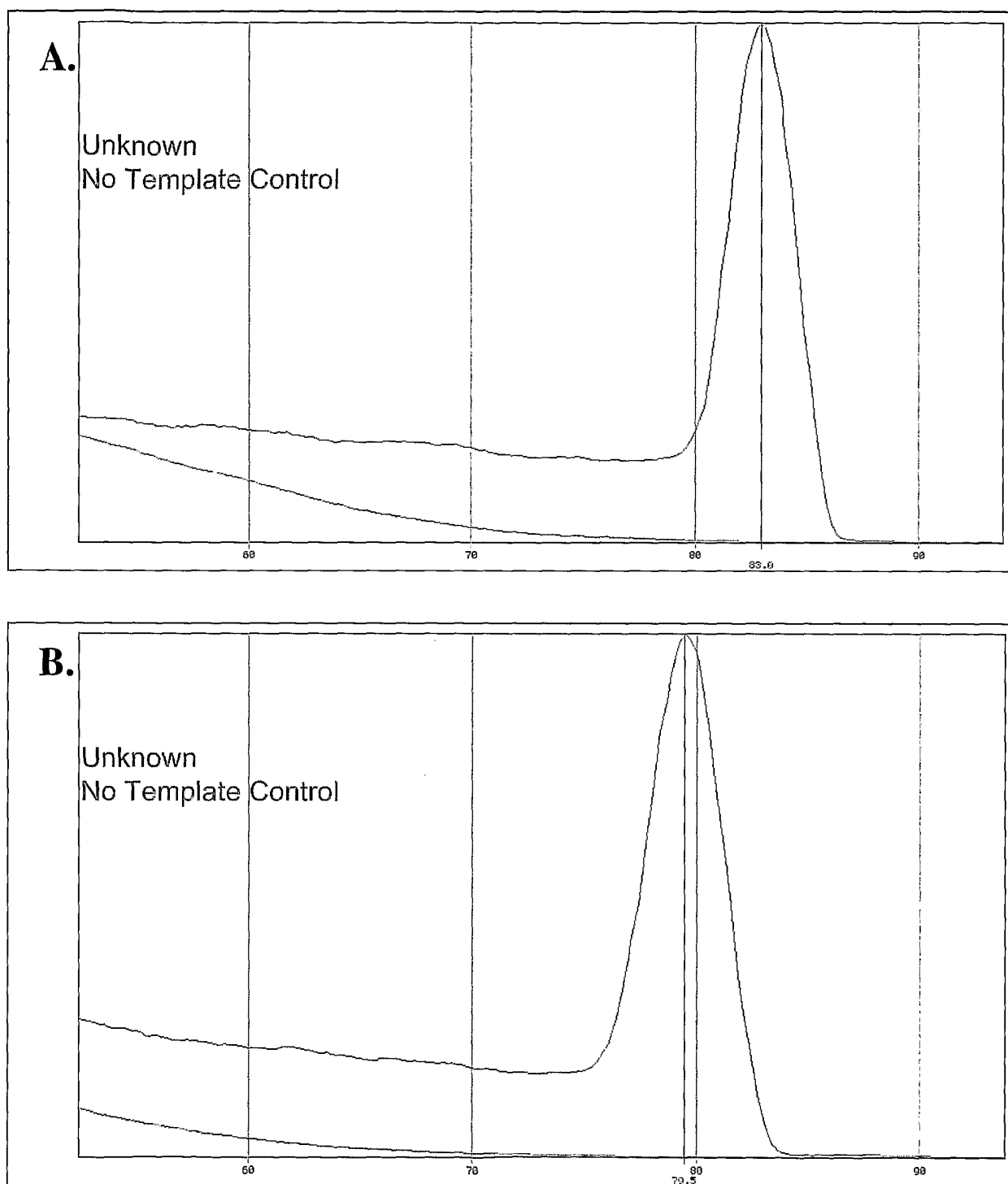


Figure 6

7/21

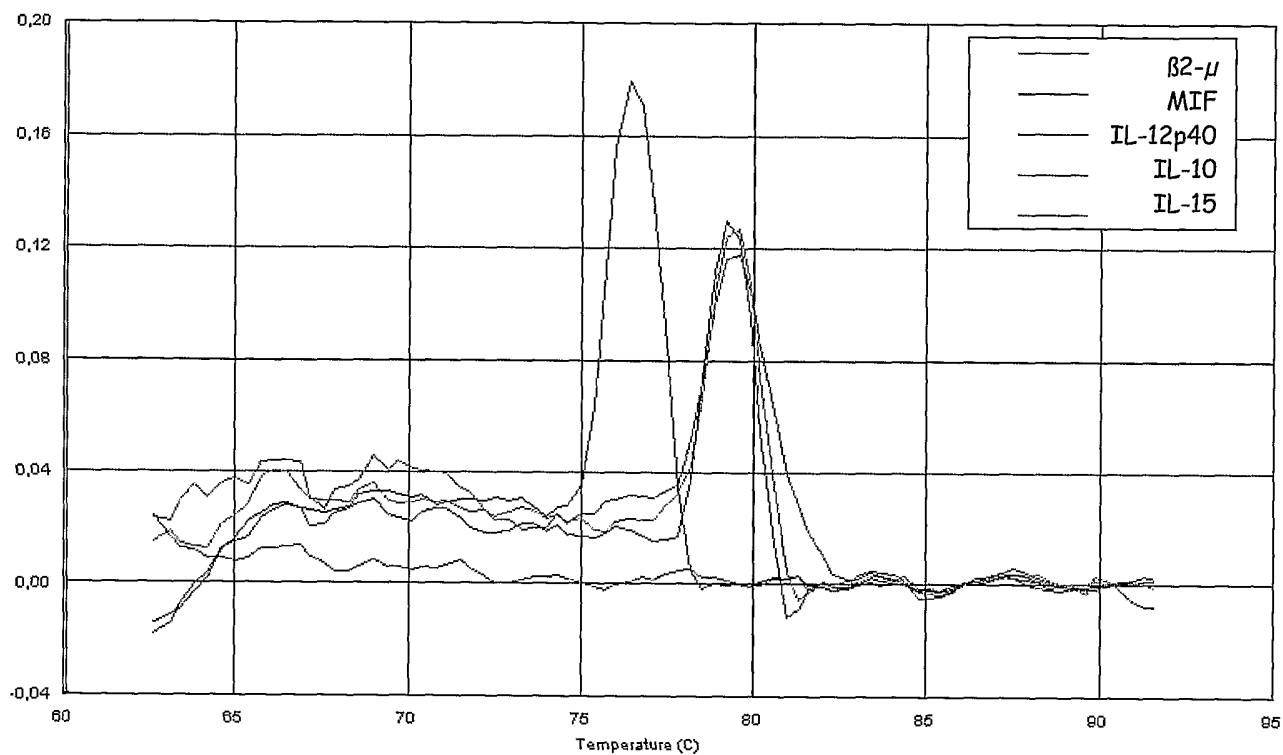
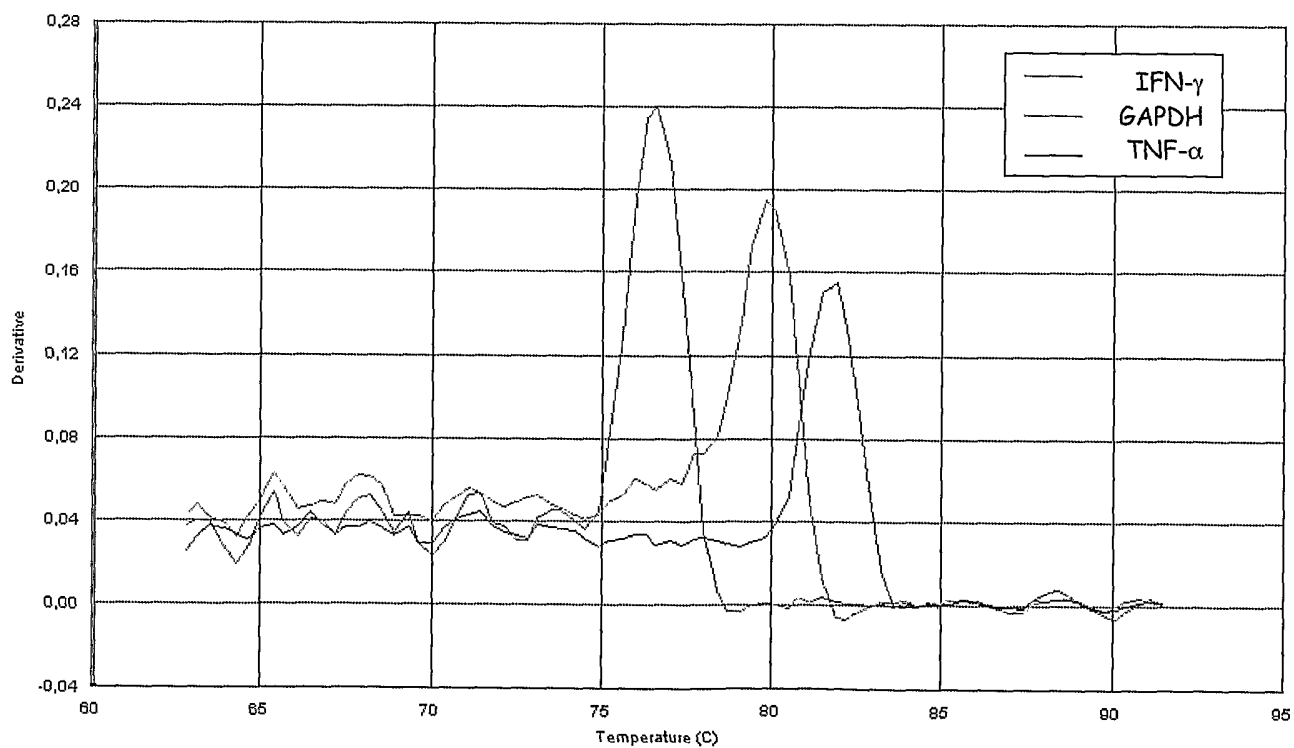
A.**B.**

Figure 7

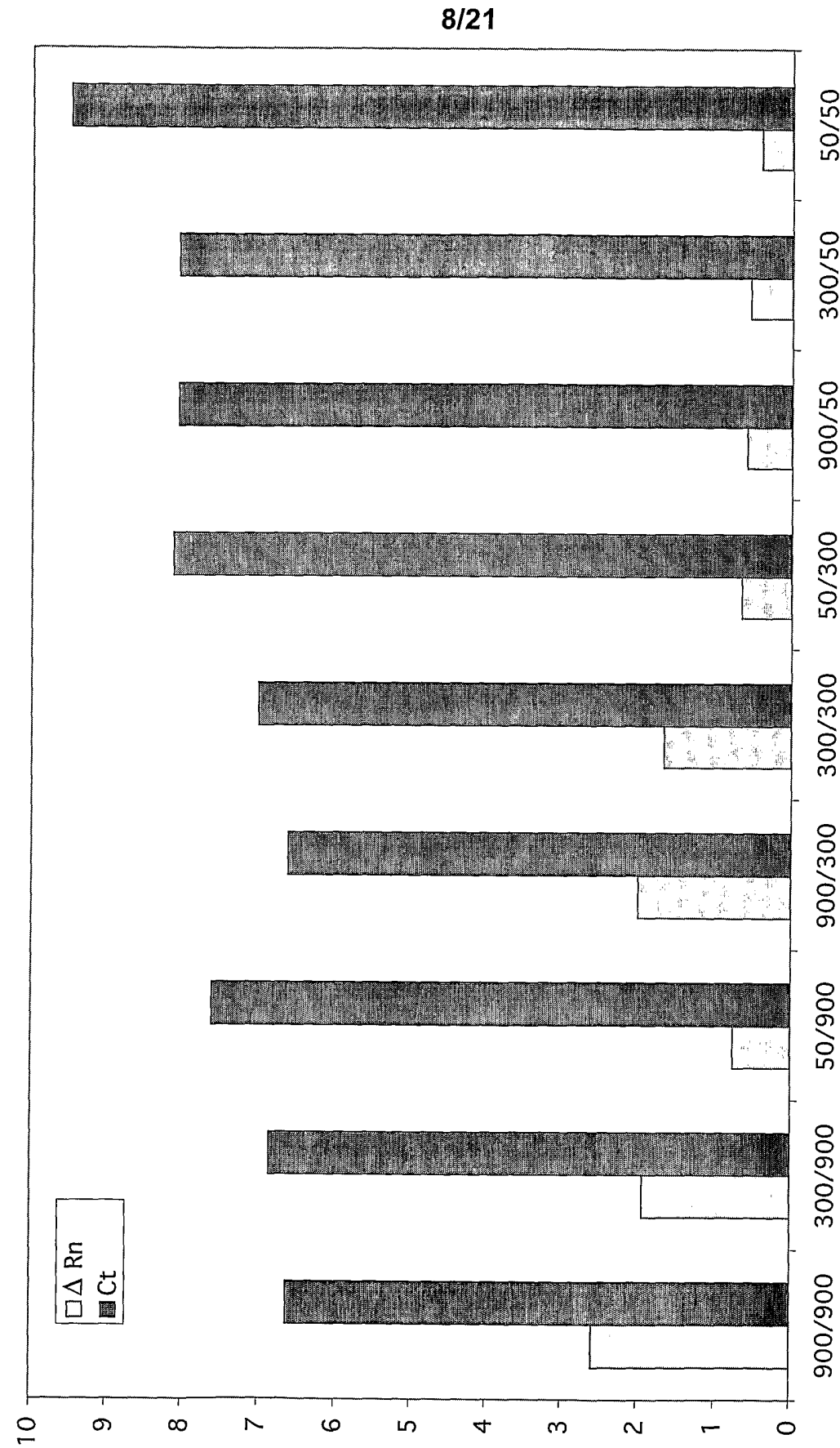


Figure 8

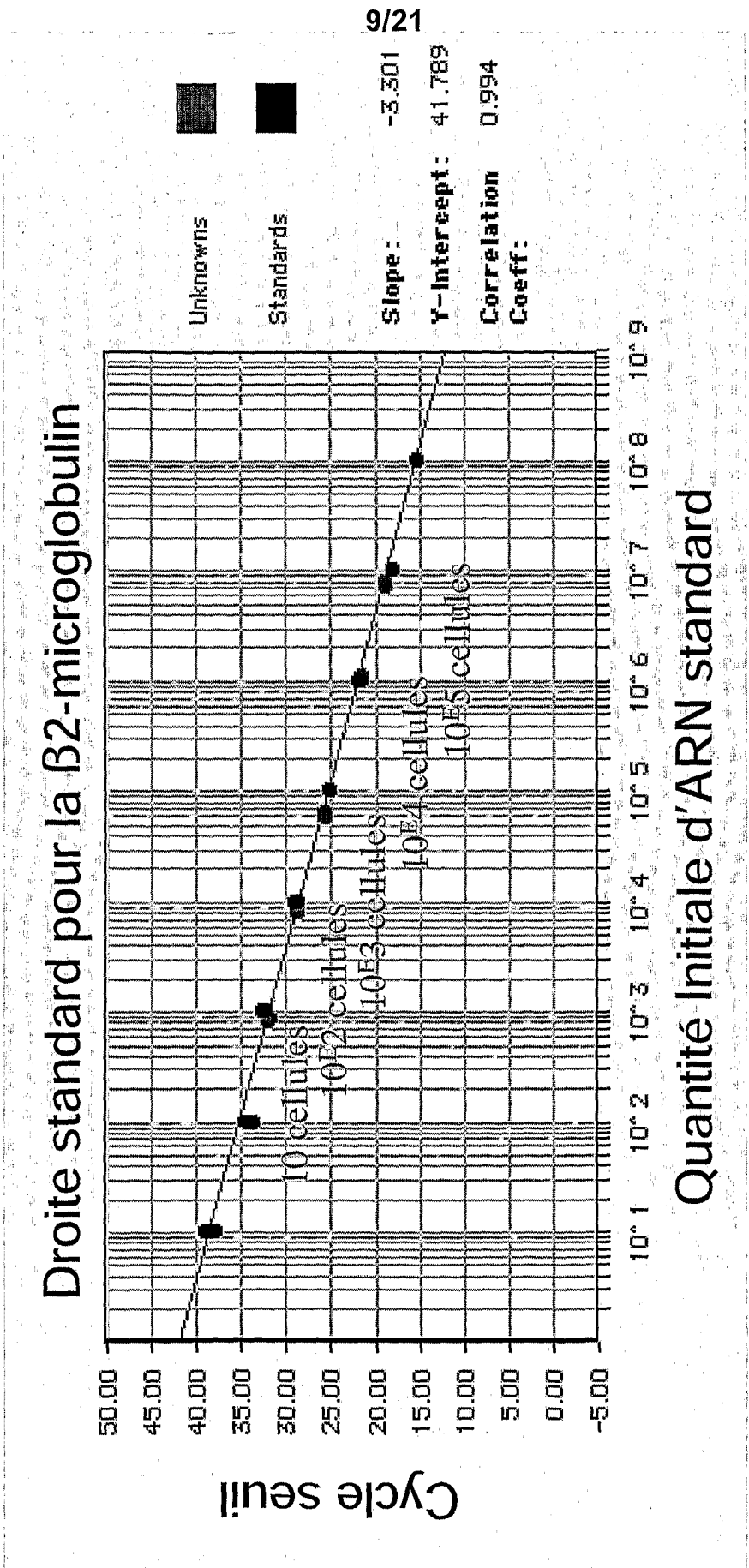


Figure 9

10/21

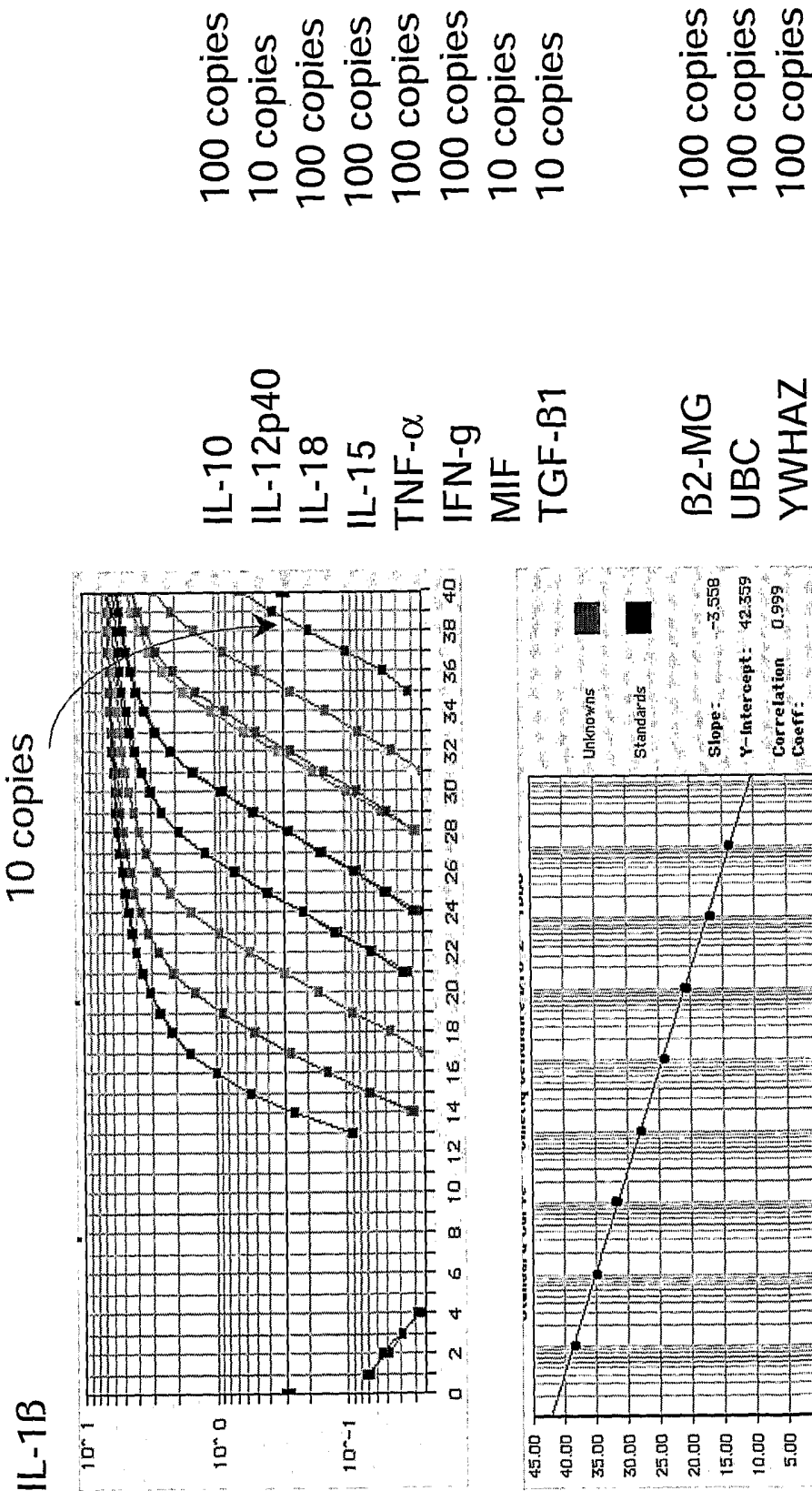


Figure 10

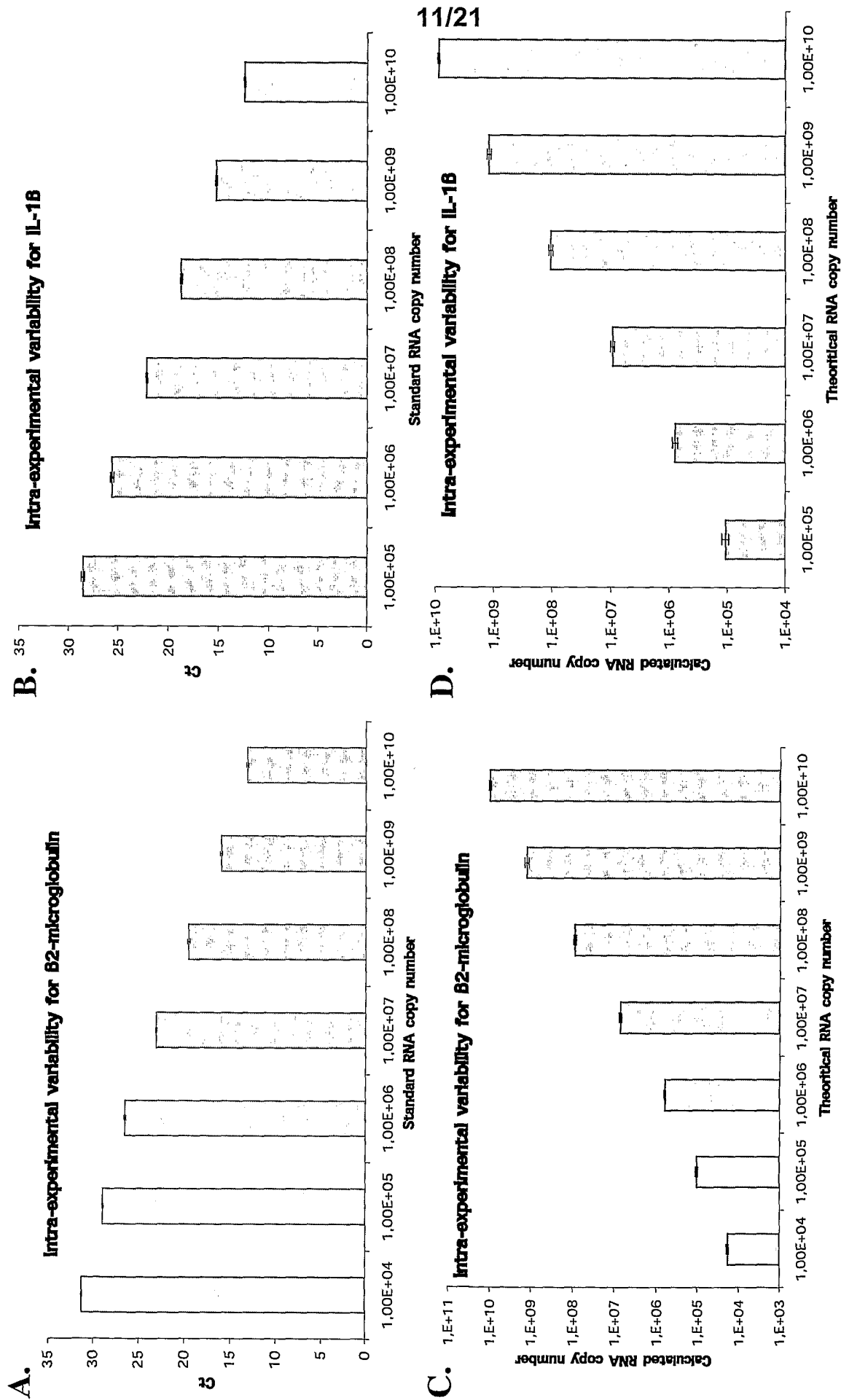


Figure 11

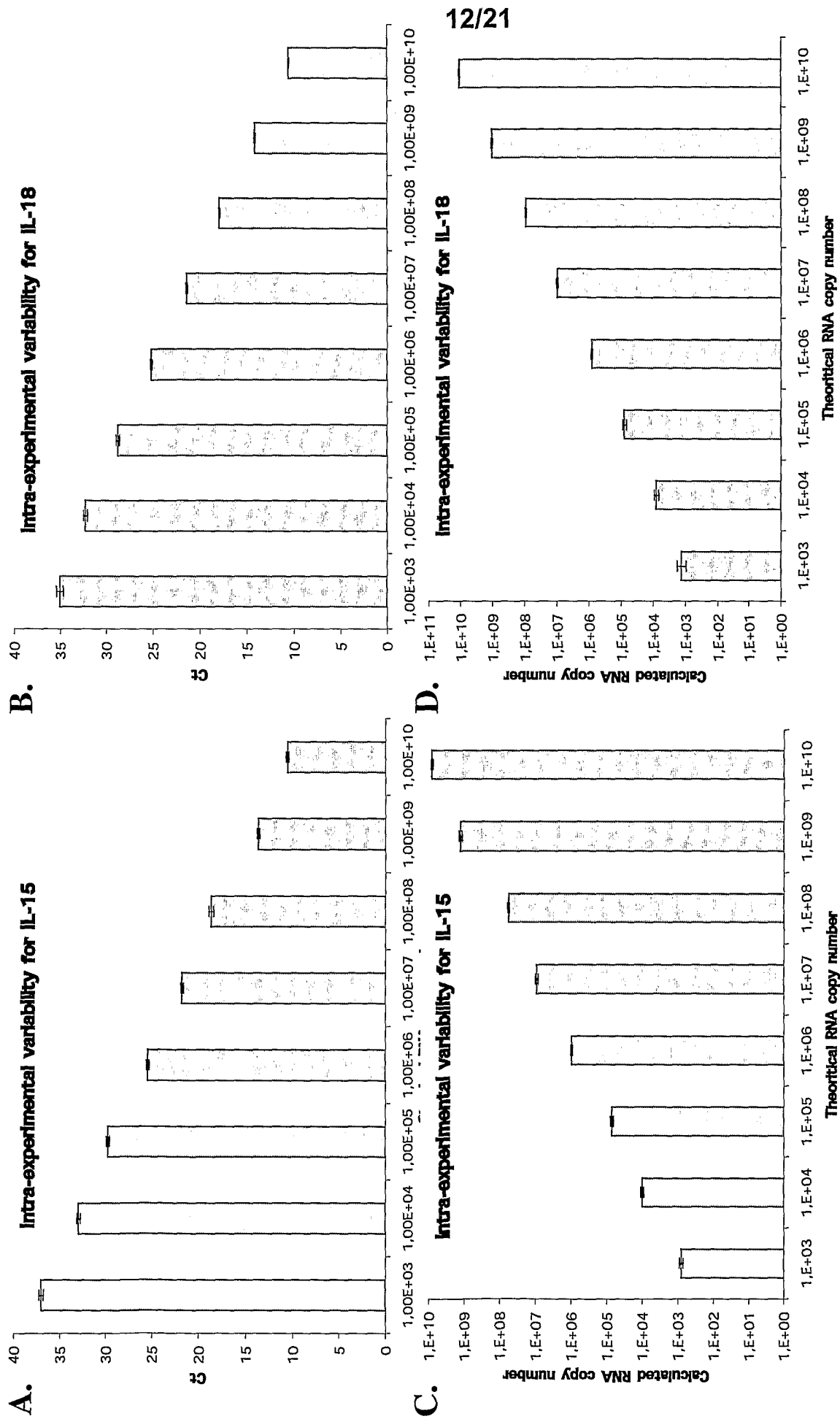


Figure 12

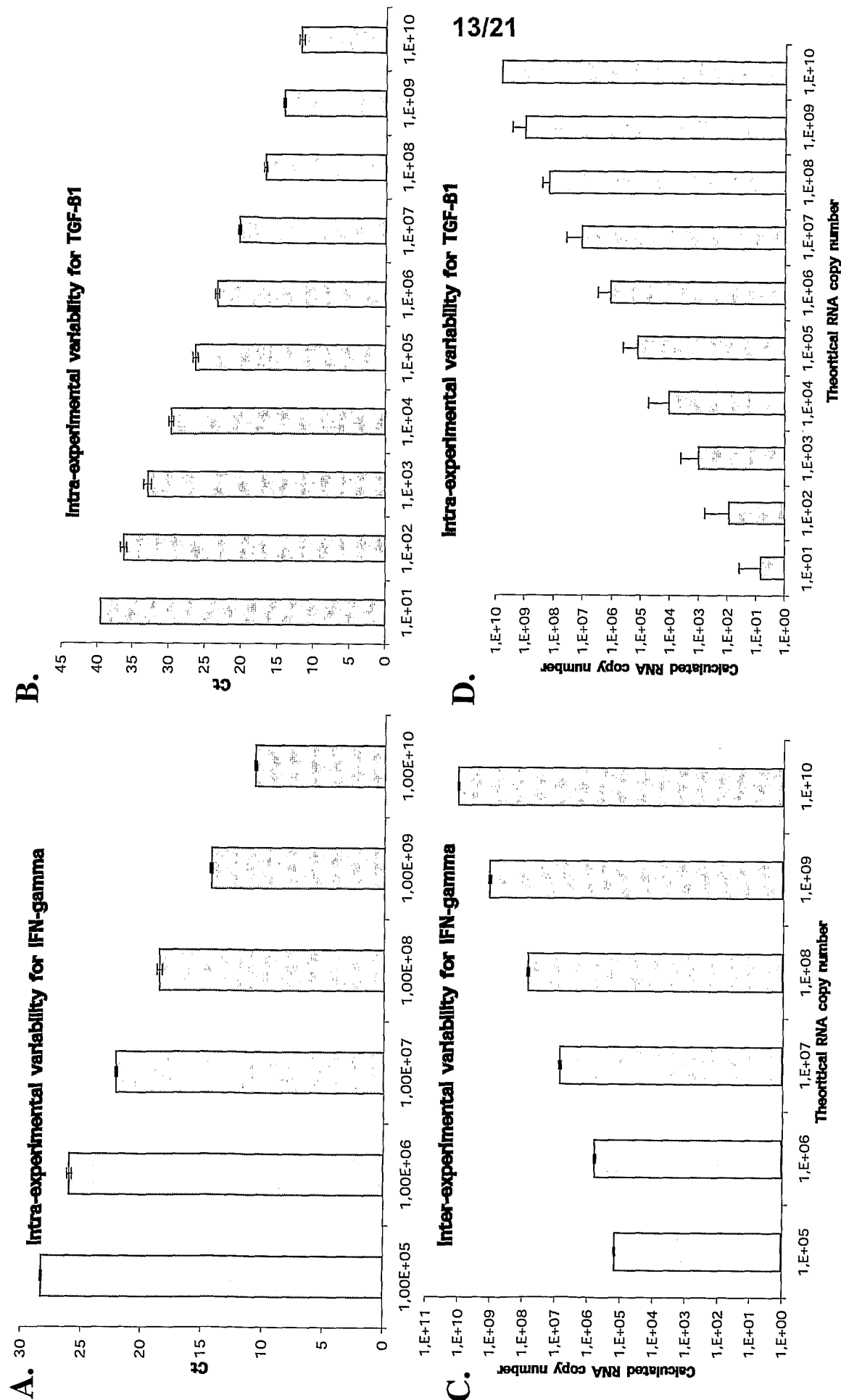


Figure 13

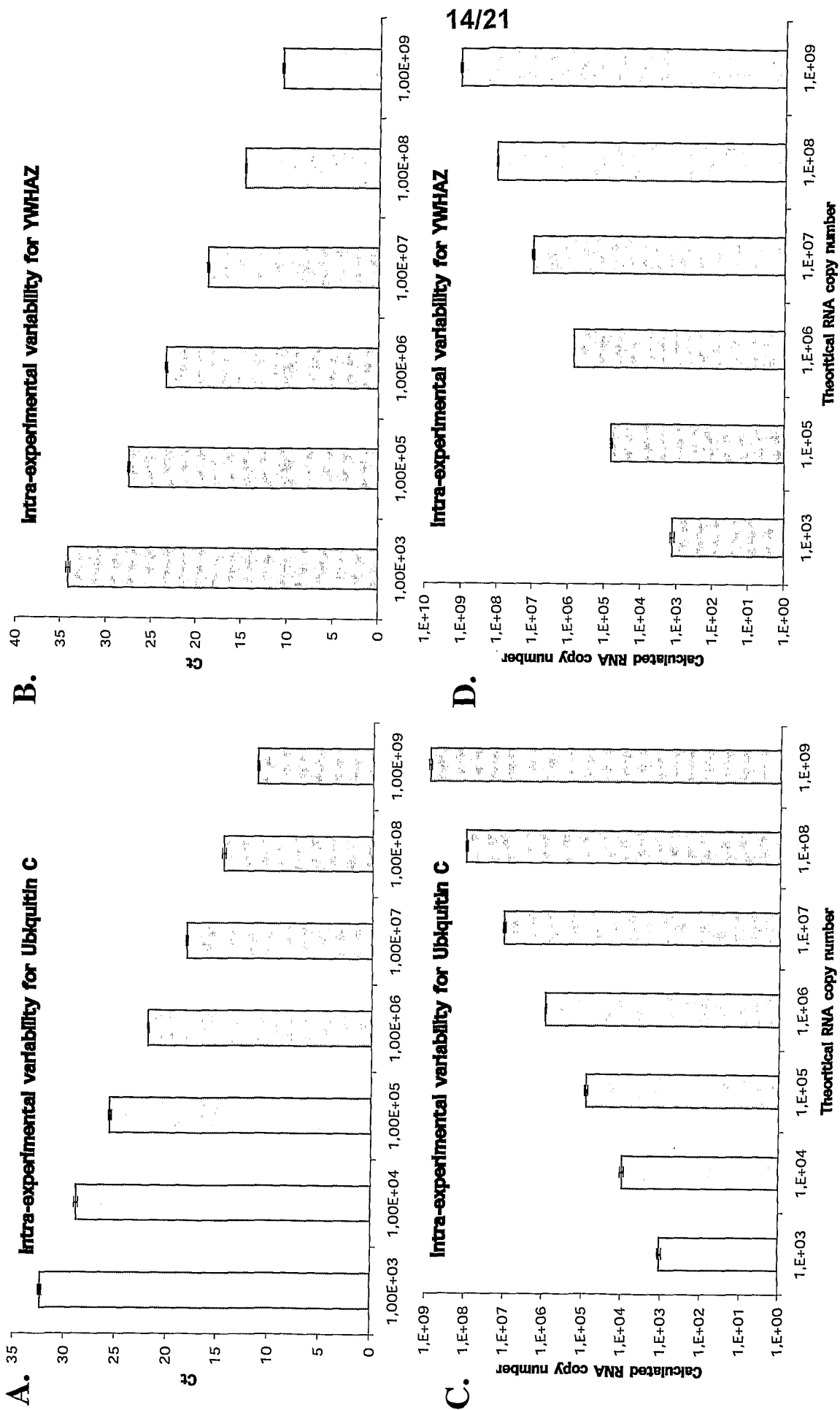


Figure 14

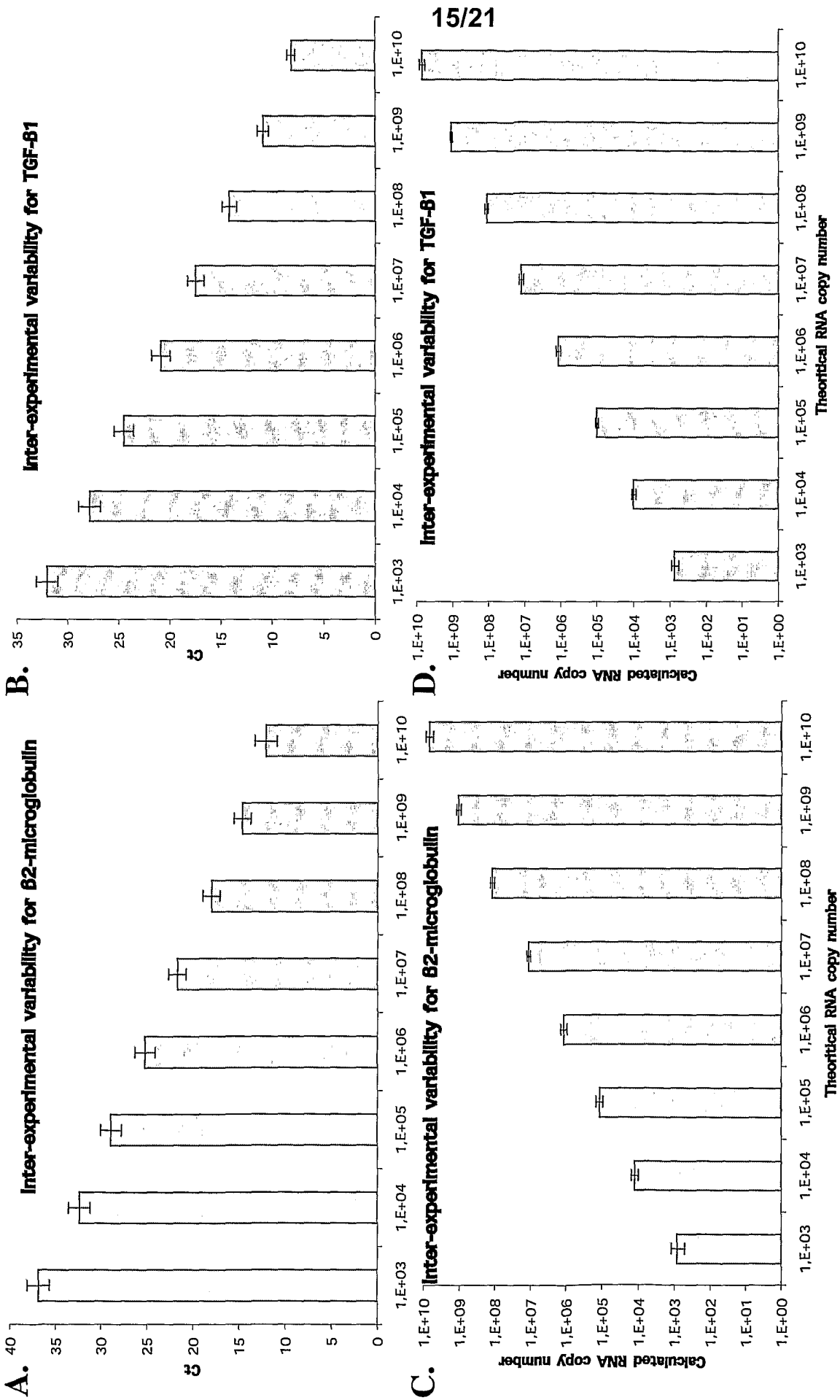
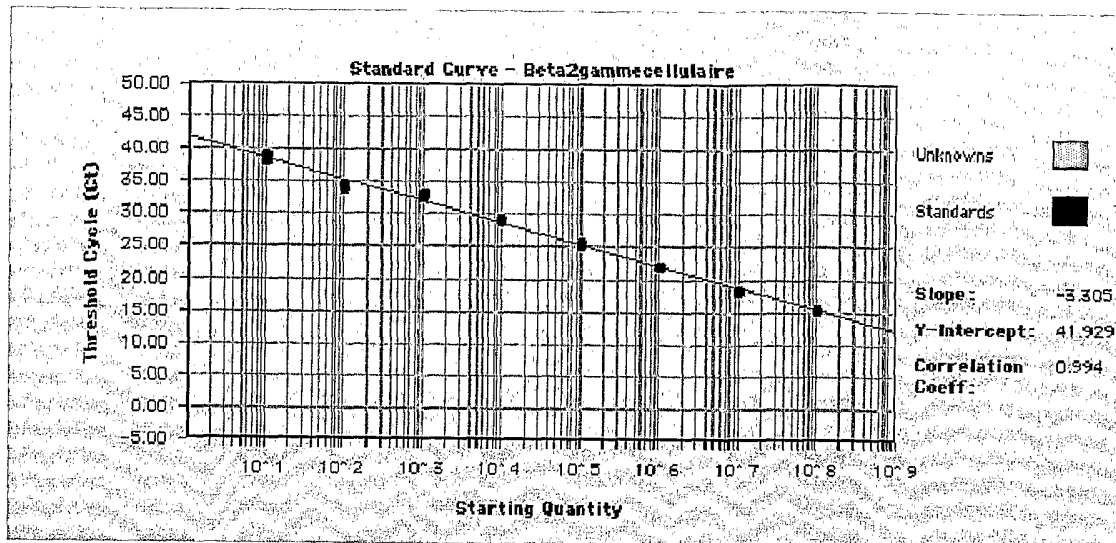


Figure 15

16/21

A.



B.

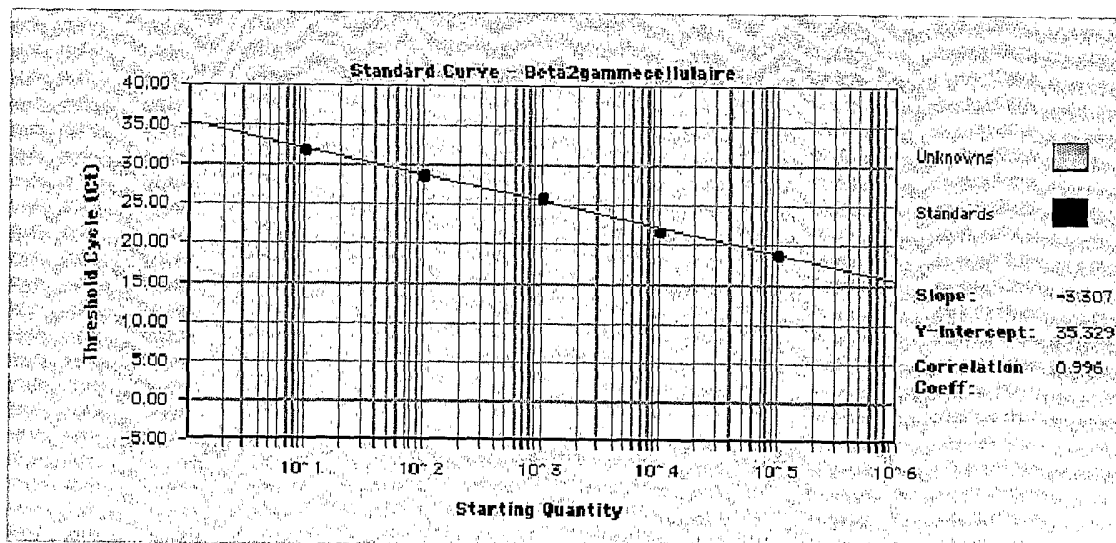
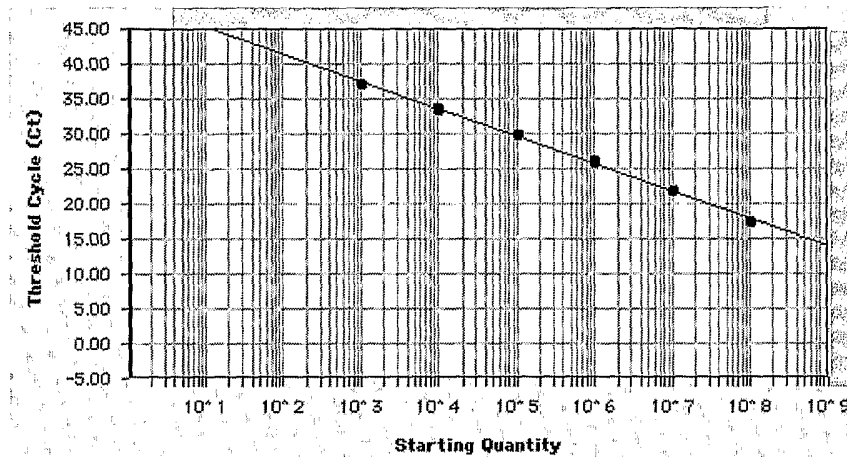


Figure 16

17/21

A. TaqMan®: pente = -3,908 / Efficacité = 80%



B. Technique de l'invention: pente = -3,198 / Efficacité = 105%

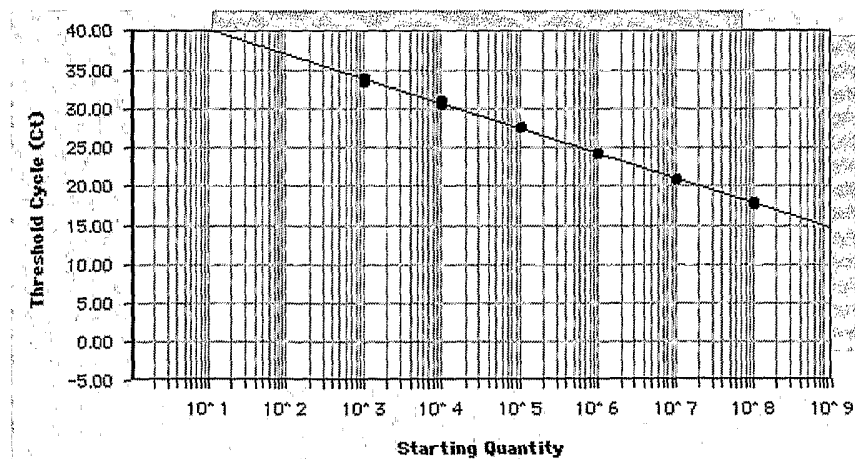


Figure 17

18/21

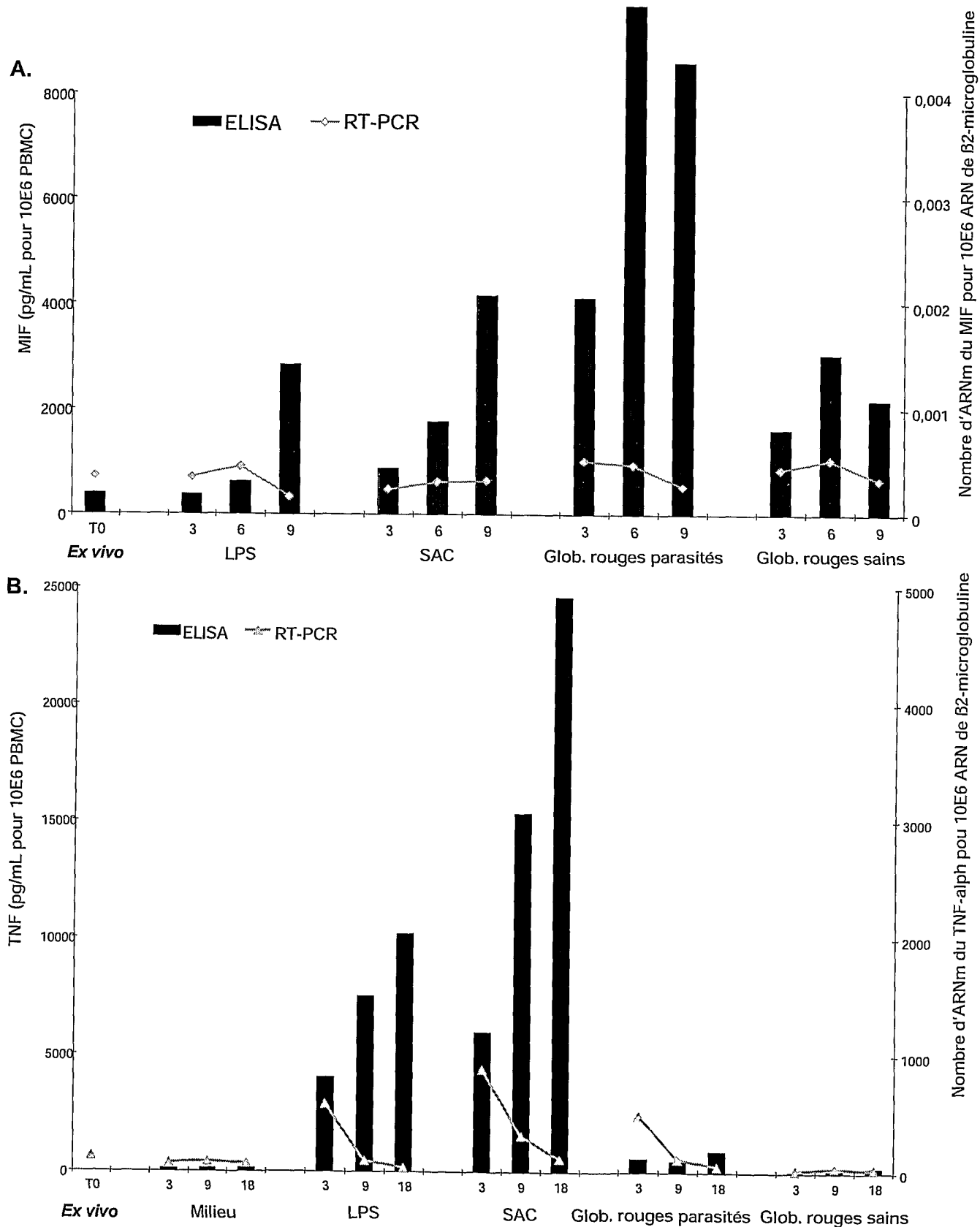


Figure 18

19/21

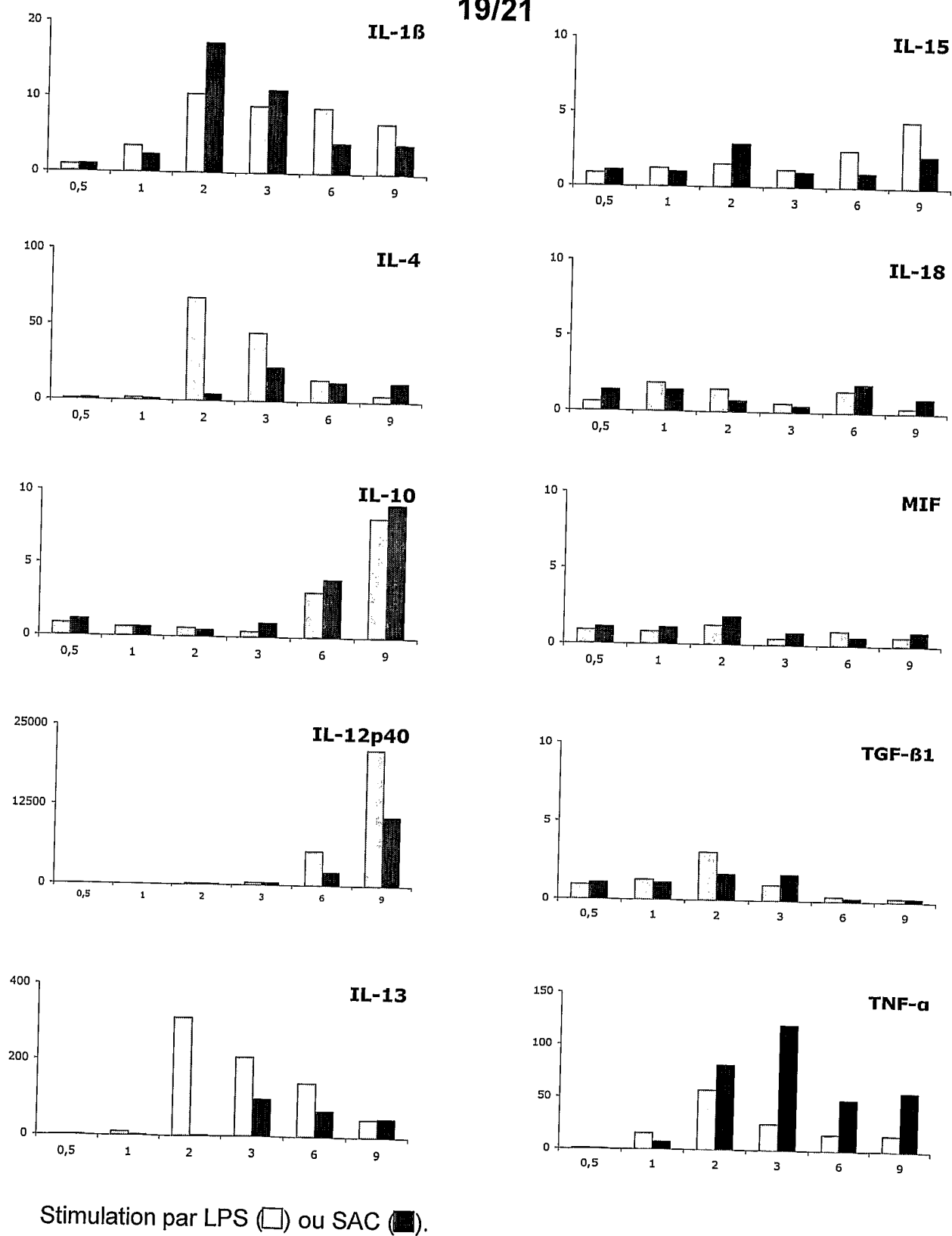


Figure 19

20/21

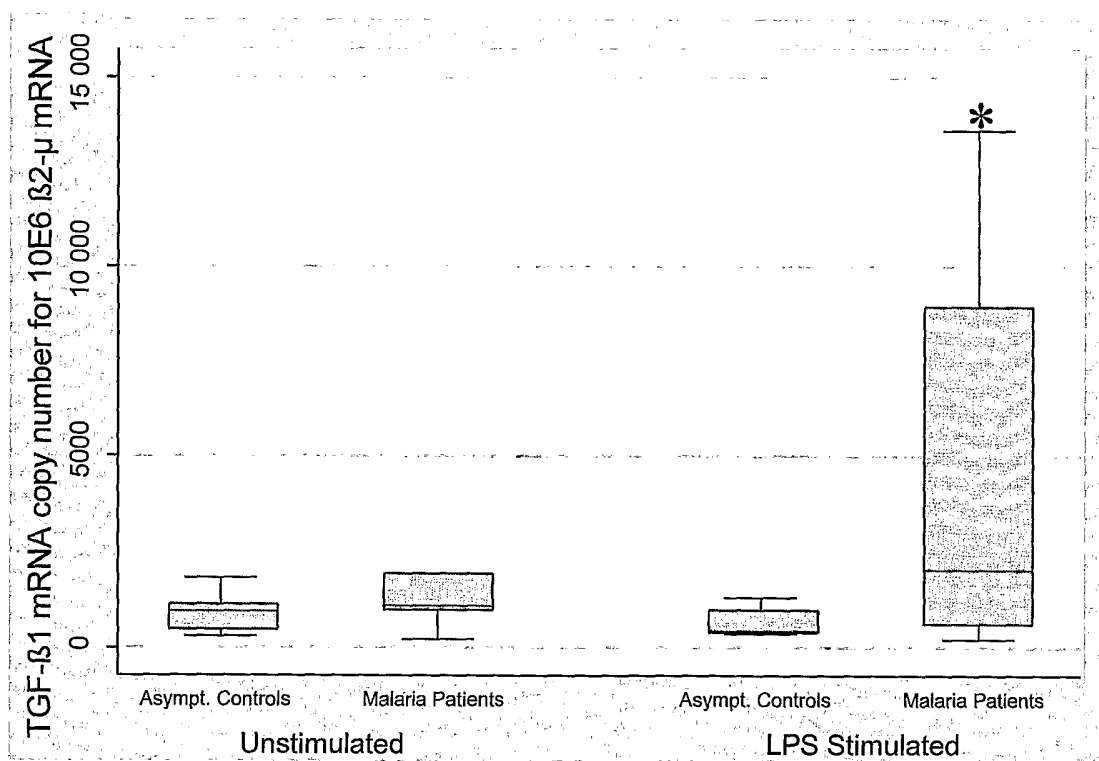
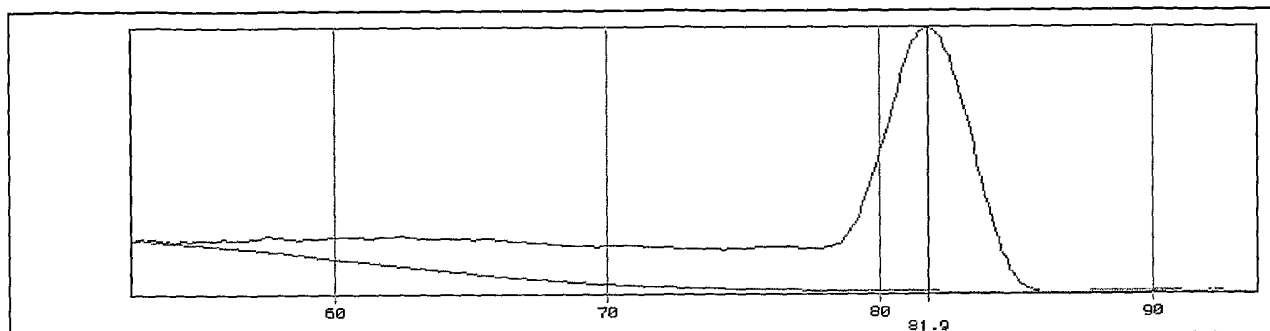


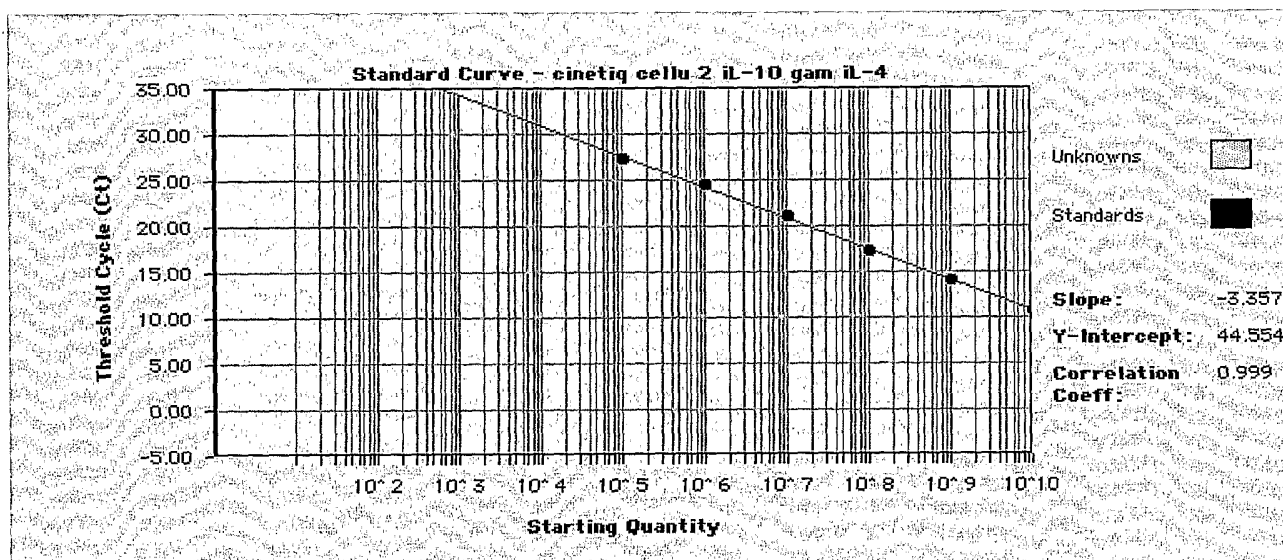
Figure 20

21/21

A.



B.



C.

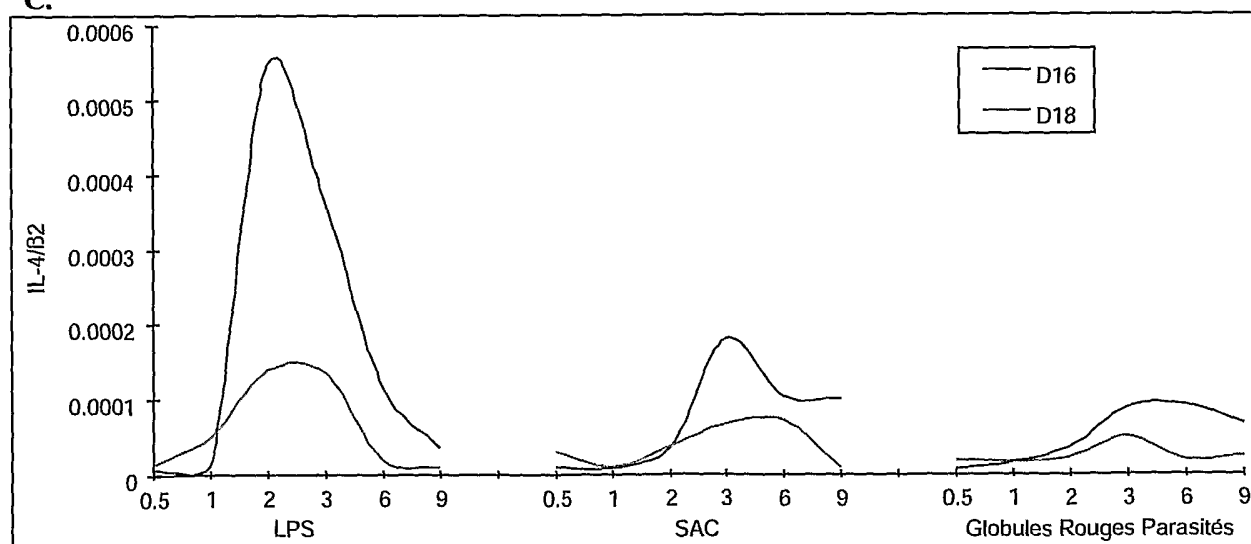


Figure 21

LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT PASTEUR

<120> QUANTIFICATION DES ARNm DE PROTEINES D'INTERET AU MOYEN D'UNE REACTION
RT-PCR EN TEMPS REEL

<130> B6108 - AD/LV/SDU

<140> FR 0408645

<141> 2004-08-04

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 1
cctgtcctgc gctgttgaaa ga 22

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 2
gggaactggg cagactcaaa 20

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 3
gctggaggac tttaagggtt acct 24

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 4
cttgatgtct gggctcttgg tct 23

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 5
catgggtggat gccgttca 18

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 6
acctccacct gccgagaat 19

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 7
acagccctca gggagctcat 20

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 8
tcaggttgat gctccatacc at 22

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 9
ccatccagtg ctacttgtgt ttactt 26

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 10
ccagttggct tctgttttag gaa 23

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 11
cctgtcctgc gctgttgaaa ga 22

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 12
gggaactggg cagactcaaa 20

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 13
gttttgggtt ctcttggtg tta 23

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 14
aaaagagttc cattatccgc tacatc 26

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 15
gcccggacag ggtctaca 18

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 16
cttaggcgaa ggtggagttg tt 22

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 17
caagggctac catgccaaact 20

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 18
agggccagga ccttgctg 18

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 19
ccccagggac ctctctctaa tc 22

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 20
ggtttgctac aacatgggct aca

23

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 21
aacagcctca cagagcagaa gac

23

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 22
gccctgcaga aggtttcctt

20

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 23
aattgaaaaa gtggagcatt caga

24

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 24
ggctgtgaca aagtcacatg gtt

23

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 25
acttttggtta cattgtggct tcaa

24

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 26
ccgccaggac aaaccagtat

20

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 27
atttgggtcg cggttcttg

19

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> AMORCE

<400> 28
tgccttgaca ttctcgatgg t

21