(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 674 254**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **91 03398**

(51) Int Cl[5] : C 12 Q 1/68

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 20.03.91.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 25.09.92 Bulletin 92/39.

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

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Cohen Jacques et Tabary Thierry.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.

(54) Détection non radioactive de la présence d'un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique.

(57) L'invention concerne un procédé pour la révélation en phase liquide d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques d'ARN ou d'ADN produites par synthèse, en présence respectivement de désoxynucléotides ou de nucléotides en excès et d'une polymérase déterminée, à partir d'un oligonucléotide amorce hybridé avec un acide nucléique que l'on cherche à détecter dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en évidence dans l'échantillon de la production de pyrophosphate (PPi), résultant de la réaction de synthèse de la (ou des) séquence(s) nucléotidique (s) spécifique (s).

FR 2 674 254 - A1

Détection non radioactive de la présence d'un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique.

L'invention concerne la révélation in vitro de la présence d'un acide nucléique déterminé, ou la détection d'un évènement particulier au sein d'un acide nucléique présent dans un échantillon biologique. Plus précisément l'invention a pour objet un procédé pour révéler dans un échantillon biologique une séquence nucléotidique synthétisée à partir d'un acide nucléique recherché dans l'échantillon, le cas échéant après amplification.

L'invention propose des moyens de révélation de la présence d'un acide nucléique recherché dans un échantillon, plus performants que ceux disponibles actuellement. En ce sens la technique de détection (ou de révélation) selon l'invention apporte une fiabilité plus grande à sensibilité de détection égale et éventuellement une sensibilité plus élevée que les techniques connues jusqu'à présent. Elle est en outre plus simple à mettre en oeuvre et se prête par conséquent à l'automatisation. Cette aptitude à l'automatisation présente un intérêt particulier pour l'utilisation en routine dans le secteur médical mais aussi dans divers types d'industries comme l'industrie agro-alimentaire.

La technique de l'invention est d'autant plus appréciable qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits radioactifs.

Ce procédé de révélation a en outre l'avantage de pouvoir être intégré dans différents procédés habituellement destinés à la détection d'acide nucléique après synthèse de séquences nucléotidiques qui en dérivent (séquences nucléotidiques néo-synthétisées), en intervenant au stade de la révélation

des produits de synthèse. Le procédé de révélation permet avantageusement l'automatisation accrue de tels procédés de détection.

L'invention propose également un kit pour la détection in vitro dans un échantillon biologique d'un acide nucléique déterminé, cette détection faisant intervenir une étape de mise en évidence d'une séquence nucléotidique néo-synthétisée à partir de cet acide nucléique.

Un procédé pour la révélation en phase liquide, d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques d'ADN ou d'ARN produites par synthèse en présence respectivement de désoxynucléotides ou de nucléotides en excès et d'une polymérase déterminée, à partir d'un nucléotide amorce hybridé avec un acide nucléique que l'on cherche à détecter dans un échantillon biologique, est selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend la mise en évidence dans l'échantillon, de la production de pyrophosphate (désigné également dans la suite par PPi), résultant de la réaction de synthèse de la (ou des) séquence (s) nucléotidique (s) spécifique(s).

La séquence ou les séquences nucléotidiques spécifiques néo-synthétisées à partir de l'échantillon biologique peuvent être obtenues quelle que soit la nature de l'acide nucléique recherché dans l'échantillon, qu'il s'agisse d'ADN, d'ARN ou d'ADNC synthétisés à partir de l'ARN ou de l'ADN recherché présent dans l'échantillon.

Il est suffisant d'ajouter les nucléotides ou les désoxynucléotides en excès dès lors que la quantité de PPi formé par la réaction de synthèse n'est pas modifiée par la présence de ces nucléotides ou désoxynucléotides à l'état libre dans le mélange.

Notons aussi que les séquences nucléotidiques néo-synthétisées sont des séquences d'ADN, d'ADNc ou d'ARN selon la nature de l'acide nucléique initialement présent et selon les conditions de réaction choisies pour la synthèse en particulier selon la nature des polymérases et nucléotides.

Le procédé selon l'invention permet la détection de séquences nucléotidiques produites par synthèse soit d'une unique copie, soit de plusieurs séquences nucléotidiques éventuellement à l'issue de plusieurs étapes de synthèse. Le procédé de révélation décrit ci-dessus est de façon particulièrement intéressante adapté à la révélation de séquences nucléotidiques produites par synthèse en phase solide ou également par synthèse en phase liquide.

Le choix d'effectuer un unique cycle ou plusieurs cycles de synthèse, est déterminé en fonction selon des paramètres habituellement considérés selon le type d'acide nucléique recherché et en particulier en fonction de la quantité présumée plus ou moins grande de copies de l'acide nucléique que l'on cherche à détecter dans l'échantillon biologique.

Par exemple lorsqu'il s'agit de rechercher un évènement rare tel qu'un génome viral il est nécessaire de réaliser préalablement une amplification par plusieurs cycles de synthèse.

En revanche lors de détection d'une infection par un organisme pathogène, l'amplification pourra être ou non nécessaire en fonction du stade de l'infection.

L'amplification peut également être évitée lorsque l'on cherche à détecter une mutation dans le génome humain.

Les désoxynucléotides utilisés pour cette réaction de synthèse d'ADN sont encore désignés de façon

générale par l'abréviation dXTP qui désigne les quatre désoxynucléotides dATP, dGTP, dCTP, dTTP.

La polymérase choisie pour effectuer la réaction de synthèse est une polymérase habituellement utilisée dans ce type de réaction, que ce soit pour l'élongation d'une unique copie à partir d'un acide nucléique présent ou pour la multiplication du nombre de copies par exemple pour l'élongation d'un nombre exponentiel de copies par exemple par le biais d'une réaction de type PCR (Polymerase Chain Reaction). De telles polymérases sont par exemple des polymérases thermostables du type Taq polymérase ou toute enzyme possédant une activité polymérase 3',5,' capable de synthétiser dans des conditions déterminées le brin complémentaire d'un acide nucléique présent dans l'échantillon.

On peut utiliser aussi des polymérases non thermostables comme la polymérase de Klenow, notamment lorsque la détection de PPi est réalisée sur une copie simple de l'acide nucléique recherchée. Une ARN polymérase sera choisie pour synthétiser de l'ARN.

La nature de l'enzyme polymérase ainsi que la quantité de désoxynucléotides présents dans la réaction de synthèse peuvent aussi de manière avantageuse, être déterminées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont on cherche à synthétiser une ou plusieurs copies et en fonction de la nature de la ou des séquences néo-synthétisées selon qu'il s'agit d'ADN, notamment d'ADNc, ou d'ARN.

Par ailleurs, la synthèse d'ARN ou d'ADN peut être effectuée à partir par exemple d'une amorce spécifique d'un gène donné capable d'hybrider avec un acide nucléique, notamment ARN recherché ou à partir

d'amorces non spécifiques telles que des polynucléotides (poly A par exemple).

La synthèse d'ADNc peut être réalisée en faisant réagir une transcriptase inverse (ou réverse transcriptase, RT) à partir d'une amorce capable d'hybrider spécifiquement ou d'une amorce de polynucléotides (poly A, poly T), avec un acide nucléique recherché.

Les conditions de stringence mises en oeuvre pour effectuer l'hybridation sont les conditions habituelles utilisées en particulier dans les réactions de PCR, notamment des conditions de stringence forte pour assurer l'hybridation spécifique des amorces sur les acides nucléiques utilisés comme matrices.

Des conditions de plus faible stringence sont acceptables lorsque les acides nucléiques que l'on cherche à détecter sont de nature telle ou en quantité telle que des mésappariements des amorces utilisées ne modifient pas le résultat du ou des cycle (s) de synthèse ou permettent d'amplifier simultanément les différents membres d'une famille génique.

Il est entendu que les synthèses dont il est question ci-dessus sont effectuées soit à partir d'acide nucléique double brin, après une étape de dénaturation, soit à partir d'acide nucléique simple brin.

Il est tout à fait intéressant et fondamental dans le cadre de la réalisation de l'invention, de remarquer que la quantité de pyrophosphate produit dans le cadre de la réaction de synthèse de séquences nucléotidiques particulières, coïncide de façon directement proportionnelle avec la quantité de nucléotides incorporés dans la séquence synthétisée au cours de la réaction. Par conséquent la quantité de PPi produit est

directement proportionnelle à la quantité de séquences nucléotidiques dont on connait la longueur, produites au cours de la synthèse. La quantité de PPi produit permet donc de déduire le poids de séquences nucléotidiques obtenues et en conséquence en fonction du nombre d'étapes de synthèse, on peut en déduire la quantité en poids d'acide nucléique présent dans l'échantillon.

On peut également exprimer la quantité de PPi produit en quantité molaire, c'est à dire en quantité molaire de nucléotides incorporés ce qui correspond à la quantité molaire de séquences nucléotidiques synthétisées (également désignées par acides nucléiques néo-synthétisés ou séquences nucléotidiques néo-synthétisées).

Le procédé de révélation selon l'invention permet donc d'obtenir très rapidement des résultats quant à la quantité d'acides nucléiques néo-synthétisés, et ce par exemple par référence à une courbe préétablie qui traduirait la quantité de nucléotides incorporés dans un acide nucléique (par exemple en ordonnée) en fonction de quantités de pyrophosphate produit au cours de cette incorporation (par exemple en abscisse).

Une fois établie, une telle courbe peut être utilisée comme référence, quelle que soit la composition de l'acide nucléique recherché, puisque la production de pyrophosphate est indépendante de la nature de l'acide nucléique (ADN, ARN), de la nature et de l'ordre (séquence) des nucléotidiques.

La mise en oeuvre du procédé de révélation dont la définition est donnée ci-dessus, peut être adaptée selon les besoins. On peut en effet doser la quantité de pyrophosphate produit, à l'issue de l'étape de synthèse lorsqu'elle est unique ou à l'issue de

l'ensemble des étapes de synthèse, par exemple à la fin d'un nombre déterminé de cycles de PCR.

On peut également doser la quantité de pyrophosphate produit à un moment déterminé ou à intervalles de temps déterminés au cours de la réaction de synthèse.

Selon un premier mode de réalisation du procédé de révélation de l'invention, la mise en évidence et le cas échéant le dosage quantitatif du pyrophosphate produit par synthèse de la (ou des) séquence (s) nucléotidique (s) à partir d'un acide nucléique présent dans un échantillon, sont effectués après un nombre déterminé de cycles d'amplification génique, notamment par polymérisation de chaîne (PCR).

Dans certains cas il peut être intéressant de mettre en évidence la seule production de pyrophosphate dans un échantillon placé dans des conditions propres à la synthèse de séquences nucléotidiques particulières, cette mise en évidence ne nécessitant pas de recourir ensuite au dosage. En effet selon la nature de l'acide nucléique que l'on cherche à déterminer, il n'est pas nécessairement indispensable d'obtenir un résultat quantitatif.

Au contraire dans d'autres cas le dosage (quantitatif) de PPi doit être effectué pour déterminer exactement la quantité d'acides nucléiques néo-synthétisés.

La compatibilité du procédé de l'invention avec la réalisation de la révélation à différents moments au cours de plusieurs étapes de synthèse, permet notamment en cas d'amplification génique, par exemple par PCR, de réaliser cette révélation à intervalles réguliers prédéterminés et éventuellement également à l'issue de l'ensemble des étapes d'amplification génique. Ceci

permet de déterminer la cinétique de la synthèse et ainsi de différencier le bruit de fond généré par la présence de contaminants notamment le PPi contaminant des réactifs, de la réaction spécifique dans la mesure où la cinétique du bruit de fond est différente de celle de la réaction spécifique.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de révélation de l'invention, le recours à l'amplification génique préalablement à la révélation n'est pas nécessaire. C'est le cas notamment lorsque l'acide nucléique que l'on cherche à détecter est présent en quantité suffisante pour être détecté sur la base d'un unique cycle de synthèse. Dans ce cas chaque acide nucléique présent dans l'échantillon biologique est copié au cours d'une unique étape.

Outre l'efficacité du procédé de révélation, due à la nature du marqueur choisi pour la révélation de la présence d'un acide nucléique dans un échantillon biologique donné, le procédé décrit dans les pages précédentes a également l'avantage de permettre une détection et le cas échéant un dosage aisé du pyrophosphate produit. En effet tous les moyens chimiques ou physiques appropriés permettant de détecter et le cas échéant de doser du pyrophosphate peuvent être employés dans le cadre de l'invention.

A titre d'exemple la mesure de la quantité de pyrophosphate produit correspondant à une quantité d'acides nucléiques néo-synthétisés peut être déterminée par une méthode physique, par exemple par RMN.

Cette détermination découle de l'application du principe selon lequel le spectre de résonance magnétique nucléaire du pyrophosphate est différent de celui d'un nucléotide triphosphate. Les moyens mis en

oeuvre pour effectuer la mesure sont les moyens classiques de RMN.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de révélation de l'invention, la détermination de la quantité de pyrophosphate produit est effectuée par des moyens chimiques, ceci comprenant les réactions enzymatiques adaptées, et généralement toute réaction chimique dépendante du PPi, par exemple lorsqu'il intervient en tant que réactif, la réaction donnant lieu à un signal de type colorimétrique, luminescent ou autre. Avantageusement on aura recours à une ou plusieurs réactions enzymatiques enchaînées en particulier toute cascade aboutissant à un signal colorimétrique ou une réaction en bioluminescence.

Par exemple la quantité de pyrophosphate produit dans le cadre du procédé de révélation peut être déterminée à l'issue d'une cascade de réactions enzymatiques comprenant les étapes suivantes :

- l'échantillon susceptible de contenir l'acide nucléique recherché et en conséquence susceptible de contenir le pyrophospahte produit à l'issue de la synthèse ou des synthèses de séquences nucléotidiques est mis en contact avec de l'Adénosine 5'-Phosphosulfate (APS), dans des conditions permettant la formation d'ATP,
- l'ATP obtenu à l'issue de l'étape précédente est mis en présence de luciférine, dans des conditions telles que celle-ci est dégradée en produisant un signal bioluminescent sous forme de photons,
- le cas échéant l'intensité du signal bioluminescent est lue et corrélée à la quantité de PPi ayant réagi.

La quantité déduite de pyrophosphate ayant réagi dans les étapes ci-dessus peut ensuite être corrélée à

la quantité d'acide nucléique néo-synthétisé selon ce qui a été exposé précédemment.

Préalablement à la mesure de la quantité PPi produit lors de la réaction de synthèse des séquences nucléotidiques, une mesure du bruit de fond peut être effectuée. Pour cela, les réactifs utilisés pour la révélation et le cas échéant la quantification du PPi produit lors de la synthèse des séquences nucléotidiques sont mis en contact avec le milieu dans lequel a eu lieu cette synthèse, à l'exception d'au moins un réactif nécessaire au déclenchement de la réaction avec le PPi. La lecture de bruit de fond (ou "blanc") est alors effectuée.

Un autre exemple de révélation par voie chimique conduit à un signal colorimétrique tel qu'obtenu avec une réaction telle que la suivante : l'échantillon susceptible de contenir l'acide nucléique recherché, préalablement soumis à un ou plusieurs cycles de synthèse, selon les modalités décrites dans les pages précédentes, et donc susceptible de contenir du PPi produit à l'issue de ces synthèses, est mis en contact avec une fructose 6-phosphokinase, pyrophosphate dépendante (aldolase). Le système de révélation pour mettre en évidence le produit de la réaction peut être le système NADH/NAD à l'aide d'une glycérophosphate déshydrogénase. Comme précédemment, le signal colorimétrique obtenu est ensuite corrélé à la quantité de PPi formé dans l'échantillon.

Ces mesures peuvent comme on l'a déjà dit être réalisées en fin de réaction ou lors de prélèvement séquentiel à intervalle régulier lors d'une amplification génique.

La technique de révélation pour la détection et le dosage éventuel du PPi n'étant pas analytique, la

spécificité de la réaction peut par exemple être assurée en effectuant la synthèse des séquences nucléotidiques à partir de l'acide nucléique recherché, par amplification génique par un système de type PCR nichée ("nested PCR"). Ce système a notamment été appliqué à l'amélioration de la spécificité des amplifications géniques par Porter-Jordan J. Med. Virol 90 30:85-91. Une autre possibilité pour vérifier la spécificité de la réaction de synthèse consiste à réaliser une hybridation avec une sonde spécifique de l'acide nucléique recherché, selon les techniques habituelles en phase solide, à l'issue des synthèses puis à recopier la sonde retenue après des hybridations.

Une autre caractéristique intéressante dans le cadre de l'invention est que le procédé de révélation décrit ci-dessus peut être réalisé en phase homogène et par conséquent en dehors de toute purification ou séparation du pyrophosphate produit dans l'échantillon biologique. Cette révélation en phase homogène peut être effectuée même lorsque l'acide nucléique source (acide nucléique spécifique que l'on cherche à détecter dans l'échantillon) est fixé sur une phase solide.

La révélation en phase homogène selon l'invention est une révélation en phase liquide sans séparation physique des nucléotides incorporés d'une part des nucléotides non incorporés et/ou de leurs produits de dégradation d'autre part.

Tenant compte des caractéristiques énoncées ci-dessus on peut désigner le procédé de l'invention par l'expression HPPPIM (abréviation anglaise de Homogen Phase PPi Measurement).

Lorsque cela est préférable ou nécessaire pour la sensibilité de la méthode, l'étape de mise en évidence

et éventuellement de dosage du pyrophosphate est néanmoins précédée d'un traitement du milieu de réaction dans des conditions permettant d'éliminer l'ATP présent dans le milieu et le dATP lorsqu'il est présent, par exemple par addition d'une hexokinase conduisant à la formation d'ADP. Le PPi contaminant des réactifs en particulier des désoxynucléotides non utilisés lors de la synthèse peut également être éliminé par addition d'une pyrophosphatase, elle même neutralisée à la suite de l'élimination des désoxynucléotides, par exemple par chauffage.

L'élimination du PPi contaminant permet d'atténuer, voire d'éliminer le bruit de fond généré par les réactifs utilisés lors de la synthèse des séquences nucléotidiques, la sensibilité de la détection de la présence de PPi pouvant alors atteindre 10^{-12}M de PPi.

L'invention concerne par ailleurs un procédé pour le dosage quantitatif de la teneur en séquences nucléotidiques synthétisées à partir d'un acide nucléique dont on cherche à détecter la présence dans un échantillon biologique, caractérisé par :

- la réalisation d'un nombre déterminé de cycles de synthèse de séquences nucléotidiques (séquences nucléotidiques néo-synthétisées) par extension à partir d'un oligonucléotide amorce hybridant avec l'acide nucléique recherché lorsqu'il est présent dans l'échantillon testé, en présence d'un excès de désoxynucléotides ou de nucléotides selon que l'on recherche respectivement la synthèse d'ADN ou d'ARN et d'une polymérase déterminée,
- le dosage de la quantité de pyrophosphate produit au cours de la synthèse des séquences nucléotidiques et le

cas échéant le rapport de cette mesure au bruit de fond,

- la détermination de la quantité de séquences nucléotidiques néo-synthétisées présentes dans l'échantillon biologique.

Avantageusement la détermination de la quantité d'acide nucléique néo-synthétisé présent dans l'échantillon, est réalisée en faisant correspondre la mesure de la quantité de pyrophosphate produit lors de la synthèse à partir de l'acide nucléique recherché initialement présent dans l'échantillon, avec des quantités de pyrophosphate obtenues par synthèse corrélées préalablement à des quantités connues de séquences nucléotidiques données, rapportées par exemple sur une courbe préétablie ou tout diagramme ou tableau préétablis.

Les applications de l'invention sont nombreuses et concernent des secteurs très différents. On peut notamment avoir recours aux procédés décrits dans les pages précédentes pour la détection in vitro et le cas échéant le dosage quantitatif d'un acide nucléique caractéristique d'une infection par un organisme étranger par exemple viral ou bactérien dans un échantillon biologique, en vue du diagnostic d'un état pathologique ou de la caractérisation d'une contamination dans un milieu biologique donné.

On peut donc mettre en oeuvre les procédés de l'invention pour réaliser un procédé de diagnostic de la présence d'un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique par exemple un échantillon de sang ou de sérum, ce procédé comprenant les étapes de synthèse d'au moins une copie de l'acide nucléique que l'on cherche à détecter et de révélation de la présence d'acides nucléiques néo-synthétisés, par la mise en

évidence et le cas échéant le dosage selon le protocole décrit plus haut du pyrophosphate produit par la réaction de synthèse.

Les moyens de l'invention sont appropriés pour mettre en évidence tout type d'acide nucléique qu'il soit rare (c'est à dire sous forme d'un très faible nombre de copies) ou non dans un échantillon biologique donné. En particulier tout diagnostic comprenant avantageusement des étapes d'amplification génique notamment par PCR peut bénéficier des moyens de révélation ci-dessus décrits. A titre d'exemple, les moyens ci-dessus sont adaptés au diagnostic d'une infection par un virus responsable du SIDA tel que le virus HIV (encore désigné par VIH).

Ces moyens permettent aussi le diagnostic de l'hépatite B, de l'hépatite C, des virus tels que CMV ou HPV, et aussi le diagnostic de la présence de mycobactéries.

Une autre application médicale de l'invention est la détection au sein du génome d'anomalies génétiques, pouvant résulter de substitution, addition, délétion, ou inversion de nucléotides au sein d'un acide nucléique présent dans un échantillon biologique.

Cette technique peut par exemple être utilisée dans le cas du diagnostic prénatal de certaines affections mettant habituellement en oeuvre les techniques de PCR.

Une autre application du procédé selon l'invention est le typage tissulaire.

Ce typage peut être effectué à partir d'une copie de l'ADN d'un individu réalisée lorsque cet ADN est spécifiquement retenu par un oligonucléotide sur une phase solide. On peut également avoir recours à une amplification génique spécifique d'allèles ou de

groupes de réactivité croisée réalisée avec un nucléotide spécifique et un nucléotide non spécifique d'allèles. Le typage d'histocompatibilité peut alors être effectué à l'aide d'une série de réactions permettant de déterminer de quels allèles le sujet chez lequel est effectuée la recherche est porteur, à chaque locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

Un autre type d'application des techniques de l'invention, dans des domaines différents comme par exemple l'expérimentation sur un modèle pharmacologique ou dans le cadre d'un examen de physiopathologie, est la quantification de l'expression d'un gène donné dans une cellule.

Par exemple on peut quantifier l'ARN codant pour une interleukine choisie en déterminant la quantité de copies de cet ARN qui peut être produite par la cellule, sous forme d'ADNc ou d'ARN.

La technique de l'invention offre en particulier l'avantage tout à fait intéressant de ne pas nécessiter de purification pour séparer l'ARN produit par le gène spécifique étudié des autres ARN cellulaires.

Le domaine médical n'est cependant pas le seul concerné par les applications du procédé selon l'invention. Au contraire on peut mettre en pratique les moyens décrits plus haut dans tout processus de contrôle au niveau d'un matériel biologique de la présence de contamination par des microorganismes par exemple dans l'industrie agro-alimentaire, pour détecter la présence d'une contamination particulière dans des échantillons d'aliments.

A titre d'exemple on peut citer la recherche de bactéries du genre Listeria dans les produits lactés.

L'invention fournit également des moyens permettant le contrôle par exemple du transfert d'un

acide nucléique hétérologue déterminé dans des couches cellulaires données en vue de leur recombinaison; la mise en évidence de la recombinaison peut être effectuée par détection d'acides nucléiques néo-synthétisés à partir de l'acide nucléique hétérologue que l'on a intégré dans la cellule et ce au moyen du pyrophosphate produit par la réaction de synthèse.

L'invention vise par ailleurs un kit pour la détection in vitro de la présence et éventuellement de la teneur en un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique par détection de séquences nucléotidiques néo-synthétisées d'ADN ou d'ADNc, caractérisé en ce qu'il comprend:

- les désoxynucléotides dATP, dTTP, dCTP, dGTP,
- une polymérase déterminée de préférence une polymérase, par exemple une polymérase thermostable adaptée à l'amplification génique par PCR, telle que la Taq polymérase,
- un réactif pour révéler dans un milieu en phase liquide la présence de pyrophosphate, ce réactif pouvant comprendre une ou plusieurs enzymes dépendantes du pyrophosphate, susceptibles de se comporter comme marqueur (s) bioluminescent (s) ou comme marqueur (s) colorimétrique (s).

L'invention vise aussi un kit pour la détection in vitro de la teneur en un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique par la détection de séquences néo-synthétisées d'ARN , caractérisé en ce qu'il comprend:

- les nucléotides ATP, UTP, CTP, GTP,
- une ARN polymérase déterminée, par exemple une polymérase adaptée à l'amplification génique par PCR,
- un réactif pour révéler dans un milieu en phase liquide la présence de pyrophosphate par mise en oeuvre

du procédé selon l'invention, par exemple une ou plusieurs enzymes dépendantes du pyrophosphate, susceptibles de se comporter comme marqueur (s) bioluminescent (s) ou comme marqueur (s) colorimétrique (s).

Ce kit peut par exemple être mis en oeuvre pour détecter l'ADNc.

Comme cela était précisé plus haut, le procédé de révélation selon l'invention permet d'envisager la réalisation d'automates pour la détection d'acides nucléiques dans des échantillons déterminés, de tels automates pouvant comprendre les moyens suivants :

- un dispositif permettant de préléver, le cas échéant séquentiellement, des microvolumes dans le milieu de réaction, d'incuber ces microvolumes dans une cellule de lecture par exemple un luminomètre en présence des réactifs permettant la caractérisation de la présence de PPi et éventuellement de doser la quantité de PPi, à l'exception d'au moins un réactif nécessaire à la réaction avec le PPi (réactif manquant), et ce pour réaliser la mesure du blanc (ou témoin),
- des moyens permettant d'ajouter le réactif manquant, d'incuber le temps nécessaire à la réaction et de mesurer à nouveau le signal dans le milieu de réaction après le déclenchement de la réaction mettant en oeuvre le PPi, selon des temps prédéterminés.

Eventuellement après le prélèvement des microvolumes, le dispositif permet d'incuber cet échantillon avec un mélange réactionnel de destruction de certains constituants notamment de destruction du dATP ou de l'ATP et de chauffer à nouveau pour détruire l'enzyme ayant agi sur le dATP et/ou l'ATP.

L'exemple qui suit décrit la mise en oeuvre du procédé de l'invention pour détecter un ADN amplifié.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent aussi dans les figures.

- La figure 1 représente l'évolution du signal de bioluminescence en fonction de la quantité d'acide nucléique néo-synthétisé de HIV, en phase homogène,
- La figure 2 est une courbe de cinétique obtenue par des mesures de PPi par bioluminescence au cours d'un nombre déterminé de cycles d'amplification génique,
- La figure 3 est une courbe d'étalonnage représentant des signaux de bioluminescence en fonction de quantitées données de PPi.

EXEMPLE

Exemple de détection de l'amplification génique par bioluminescence

L'ADN de la lignée ACH2 (décrite par K. Clouse J. Immunol 1989, vol. 142:431-438), contenant une copie du virus HIV par génome humain a été dilué dans une quantité constante (1 μg) d'ADN provenant d'un individu sain.

Après amplification par PCR le signal a été mesuré et représenté sous forme d'un Log base 10 du nombre d'évènements (chaque évènement correspondant à un signal de bioluminescence) par minute en ordonnée, contre le Log base 10 de la dilution de l'ADN de la lignée HIV positive. 1.10^{-12}g d'ADN correspondent approximativement à un génome équivalent et une copie du virus. Le signal est détectable au-dessus du bruit de fond jusqu'à 10 copies en manipulation manuelle.

Les réactifs mis en oeuvre dans la réaction répondent aux caractéristiques suivantes :

- PPi : PPI 10 H_2O : Merck Ref. n° 6591 (PM 446,06)
- Tris : Merck Ref. n° 8382 (PM 121,14)
- Eau haute résistivité (> 10 MOhmCm) : échange d'ions millipore (MilliQ)
- Acide acétique glacial 96% : Merck (PM 60,05; 1 litre =1,06 kg)
- APS : adénosine 5'-phosphosulfate (sel de sodium) (PM 427,3) 96% pureté conservé à -80°C :

Sigma Ref. n° A9266 (livré dans de la carboglace)
Solution à 0,1 mM en tampon Tris-AcOH 0,1 M pH 7,75

- Sulfurylase : adénosine 5'-triphosphate sulfurylase (ATP : sulfate adenylytransférase: EC 2.7.7.4) : Sigma Réf. n° A5761

Solution à 1,8 U/ml de tampon tris-AcOH 0,1 M pH 7,75

- Milieu réactionnel de la bioluminescence : kit Sigma: adénosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit, Ref. FL-AA. Le mélange réactionnel (FL-AAM) contient la luciférase, la luciférane, du $MgSO_4$, de l'EDTA, du DTT, de la BSA dans un tampon tricine. Il est dilué au 1/200 en tampon FL-AAB.

Réaction :

On met en présence dans un premier temps 100 µl de AAM dilué au 1/200, 68 µl d'eau, 12 µl de sulfurylase et 5 µl de l'échantillon contenant l'ADN de HIV et l'acide nucléique néo-synthétisé par amplification génique par PCR.

La lecture du blanc est faite après 3 mn de contact au moins. Ensuite on ajoute 10 µl d'APS qui déclenche la réaction avec le PPi produit dans l'échantillon lors de l'amplification génique.

La lecture est effectuée après une minute exactement de la luminescence (moyenne de l'émission pendant 2 secondes sur 30 secondes).

Il est possible de procéder à un étalonnage interne par addition successive de 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9} mole de PPi dans le tube réactionnel sous 10 µl et lire 30 secondes après 1 mm d'incubation.

Une autre possibilité est d'effectuer un étalonnage externe selon les modalités suivantes :

100 µl AAM dilué, 68 µl d'eau, 12 µl de sulfurylase et 10 µl d'APS sont mis en contact puis on procède à la lecture du blanc. Ensuite on ajoute 10 µl de solution diluée de PPi pour avoir une quantité de 10^{-11} mole de PPi dans le tube et on effectue la lecture après une minute exactement, sur 30 secondes.

On ajoute 10 µl de solution diluée de PPi pour avoir une quantité de 10^{-10} mole de PPI dans le tube et

on poursuit de la même façon avec un ajout de 10 μl de PPi pour avoir 10^{-9} mole de PPi dans le tube.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

1/ G DNA	Signal	Log Signal
6	16782	4.225
7	11378	4.056
8	4997	3.699
9	1902	3.279
10	1248	3.096
11	541	

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la révélation en phase liquide d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques d'ADN ou d'ARN produites par synthèse, en présence respectivement de désoxynucléotides ou de nucléotides en excès et d'une polymérase déterminée, à partir d'un oligonucléotide amorce hybridé de façon spécifique avec un acide nucléique que l'on cherche à détecter dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en évidence dans l'échantillon de la production de pyrophosphate (PPi), résultant de la réaction de synthèse de la (ou des) séquence(s) nucléotidique (s) spécifique (s).

2. Procédé de révélation selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on dose la quantité de pyrophosphate produit à un moment déterminé de la synthèse.

3. Procédé de révélation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la mise en évidence et le cas échéant le dosage quantitatif du pyrophosphate produit par synthèse de la (ou des) séquence(s) nucléotidique(s) à partir d'un acide nucléique présent dans un échantillon, sont effectuées après un nombre déterminé de cycles d'amplification génique, notamment par polymérisation de chaîne (PCR).

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la mise en évidence et le cas échéant le dosage quantitatif du pyrophosphate sont réalisés à plusieurs moments au cours de l'amplification génique, en particulier à intervalles réguliers prédéterminés et/ou à l'issue de l'amplification génique, en particulier en vue de déterminer la cinétique de la synthèse.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour la révélation de la synthèse d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques, caractérisé en ce que la mise en évidence du pyrophosphate produit est effectuée sur un échantillon biologique donné soumis à une unique étape de synthèse.

6. Procédé de révélation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 , caractérisé en ce que la mesure de la quantité de pyrophosphate produit est effectuée par RMN.

7. Procédé de révélation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la mesure de la quantité de pyrophosphate produit est effectuée à l'issue d'une ou plusieurs réactions enzymatiques dépendantes du PPi, notamment de type colorimétrique ou par bioluminescence.

8. Procédé de révélation selon la revendication 7, caractérisé en ce que la quantité de pyrophosphate est déterminée à l'issue d'une cascade de réactions enzymatiques comprenant les étapes suivantes :

- l'échantillon susceptible de contenir l'acide nucléique recherché et en conséquence susceptible de contenir le pyrophosphate produit à l'issue de la synthèse ou des synthèses de séquences nucléotidiques est mis en contact avec de l'Adénosine 5'-Phosphosulfate (APS), dans des conditions permettant la formation d'ATP,
- l'ATP obtenu à l'issue de l'étape précédente est mis en présence de luciférine, dans des conditions telles que celle-ci est dégradée en produisant un signal bioluminescent sous forme de photons,
- le cas échéant la lecture de l'intensité du signal bioluminescent et la corrélation avec la quantité de PPi ayant réagi.

9. Procédé de révélation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le pyrophosphate mis en évidence et le cas échéant dosé quantitativement est produit par synthèse d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques spécifiques à partir d'ADN, d'ARN ou d'ADNc présent dans l'échantillon.

10. Procédé de révélation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 , caractérisé en ce qu'il est réalisé en phase homogène.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape de mise en évidence et éventuellement de dosage du pyrophosphate est précédée d'un traitement du milieu de réaction dans des conditions permettant d'une part d'éliminer l'ATP présent dans le milieu et le dATP, par exemple par addition d'une hexokinase conduisant à la formation d'ADP, et d'autre part d'éliminer le PPi contaminant, les autres désoxynucléotides par addition d'une pyrophosphatase, elle même neutralisée à la suite de l'élimination des désoxynucléotides, par exemple par chauffage.

12. Procédé pour le dosage quantitatif de la teneur en séquences nucléotidiques synthétisées à partir d'un acide nucléique dont on cherche à détecter la présence dans un échantillon biologique, caractérisé par :

- la réalisation d'un nombre déterminé de cycles d'amplification génique par synthèse de séquences nucléotidiques par extension à partir d'un oligonucléotide amorce hybridant avec l'acide nucléique recherché lorsqu'il est présent dans l'échantillon testé, en présence d'un excès de désoxynucléotides ou de nucléotides selon que l'on

cherche respectivement la synthèse d'ADN ou d'ARN et d'une polymérase déterminée,

- le dosage de la quantité de pyrophosphate produit au cours de l'amplification génique et le rapport de cette mesure au bruit de fond,
- la détermination de la quantité de séquences nucléotidiques présentes dans l'échantillon biologique.

13. Procédé de détection selon la revendication 12 caractérisé en ce que la détermination de la quantité d'acide nucléique présent dans l'échantillon, est réalisée après comparaison de la mesure de la quantité de pyrophosphate produit lors de la synthèse de séquences nucléotidiques à partir de l'acide nucléique, avec des quantités connues de pyrophosphate obtenues par synthèse de quantités connues de séquences nucléotidiques données, rapportées par exemple sur une courbe d'étalonnage préétablie.

14. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour la détection in vitro et le cas échéant le dosage quantitatif d'un acide nucléique viral ou d'un acide nucléique bactérien dans un échantillon biologique, en vue du diagnostic d'un état pathologique ou de la caractérisation d'une contamination dans un milieu biologique.

15. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour la détection d'une anomalie génétique, par exemple par substitution, addition, délétion, inversion de nucléotides, au sein d'un acide nucléique présent dans un échantillon biologique.

16. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour le typage tissulaire.

17. Kit pour la détection in vitro de la teneur en un acide nucléique déterminé dans un échantillon

biologique par détection de séquences nucléotidiques néo-synthétisées d'ADN ou d'ADNc, caractérisé en ce qu'il comprend :

- les désoxynucléotides dATP, dTTP, dCTP, dGTP,
- une polymérase déterminée, par exemple une polymérase thermostable adaptée à l'amplification génique par PCR,telle que la Taq polymérase,
- un réactif pour révéler dans un milieu en phase liquide la présence de pyrophosphate par mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, par exemple une ou plusieurs enzymes dépendantes du pyrophosphate, susceptibles de se comporter comme marqueur (s) bioluminescent (s) ou comme marqueur (s) colorimétrique (s).

18. Kit pour la détection in vitro de la teneur en un acide nucléique déterminé dans un échantillon biologique par détection de séquences nucléotidiques néo-synthétisées d'ARN, caractérisé en ce qu'il comprend :

- les nucléotides ATP, UTP, CTP, GTP,
- une ARN polymérase déterminée, par exemple une polymérase adaptée à l'amplification génique par PCR,
- un réactif pour révéler dans un milieu en phase liquide la présence de pyrophosphate par mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, par exemple une ou plusieurs enzymes dépendantes du pyrophosphate, susceptibles de se comporter comme marqueur (s) bioluminescent (s) ou comme marqueur (s) colorimétrique (s).

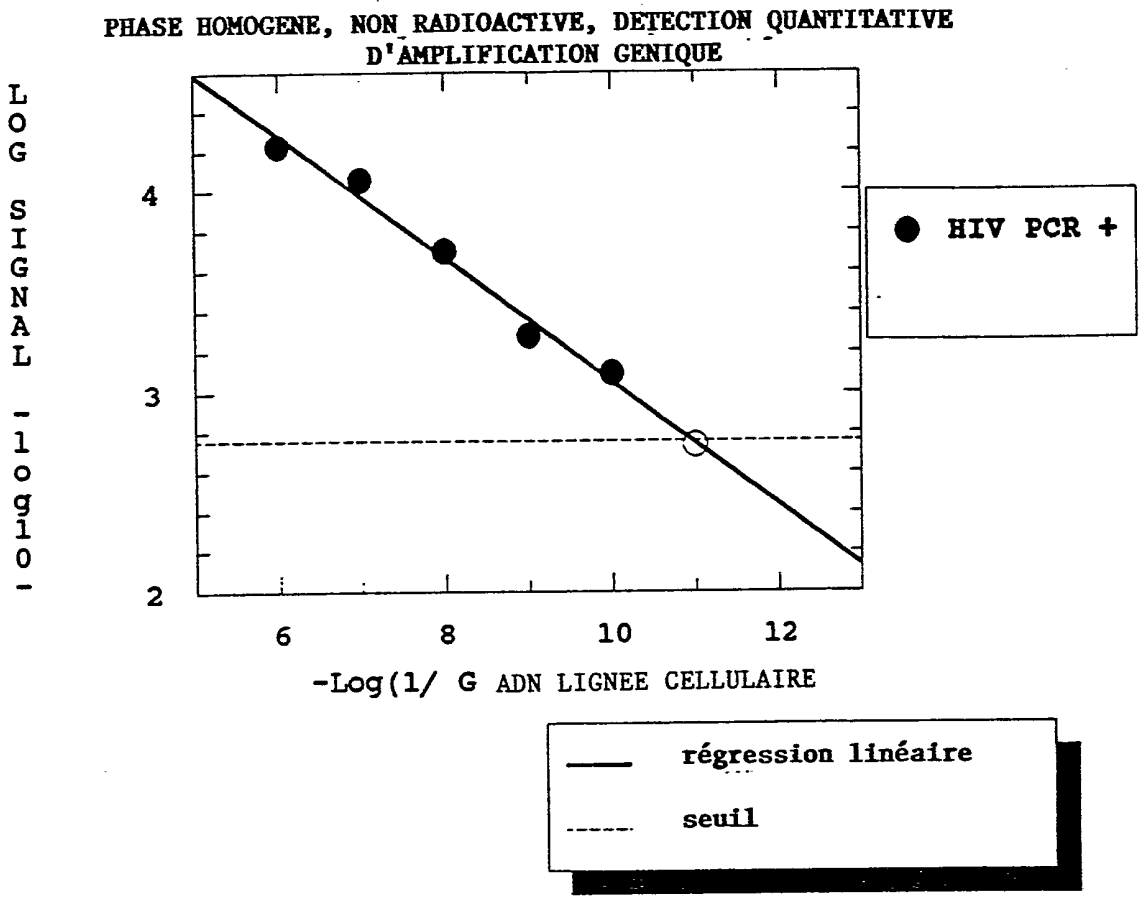

PHASE HOMOGENE, NON RADIOACTIVE, DETECTION QUANTITATIVE
D'AMPLIFICATION GENIQUE
LOG SIGNAL - log10 -
4
3
2
6
8
10
12
-Log(1/ G ADN LIGNEE CELLULAIRE
HIV PCR +
régression linéaire
seuil

FIGURE 1

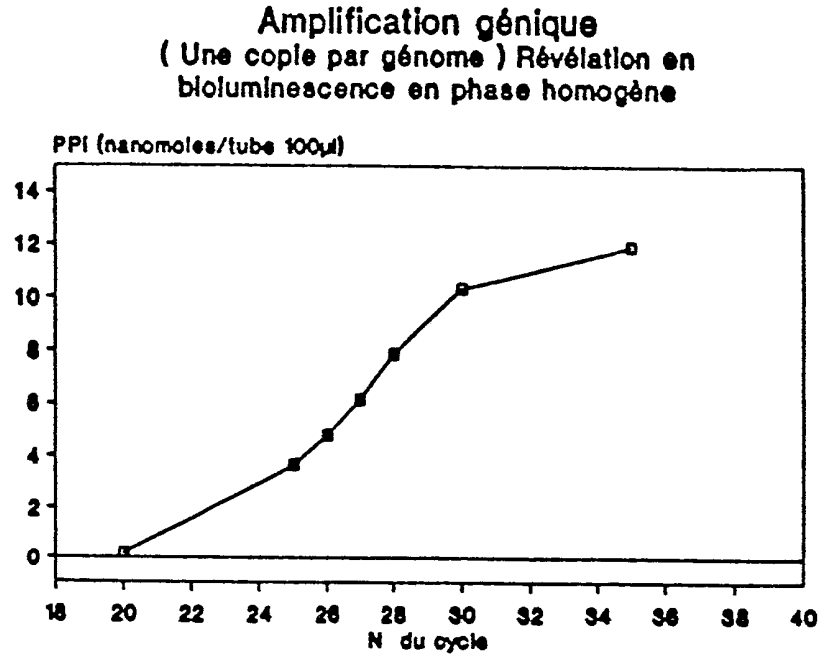

Amplification génique
(Une copie par génome) Révélation en bioluminescence en phase homogène
PPI (nanomoles/tube 100µl)
14
12
10
8
6
4
2
0
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
N du cycle

FIGURE 2

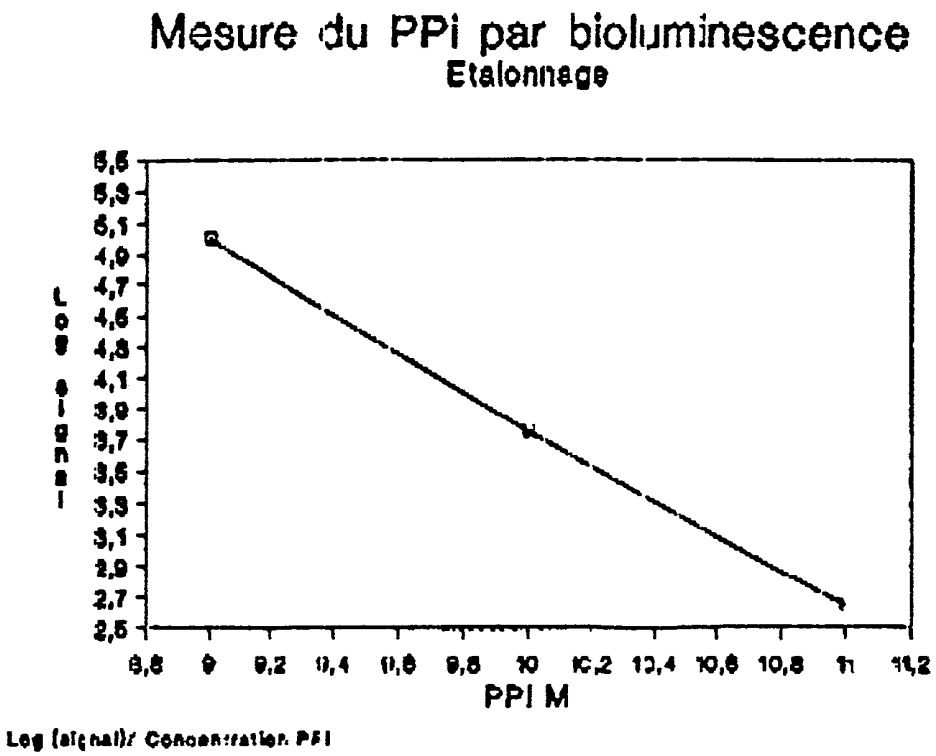

Mesure du PPi par bioluminescence
Etalonnage
Log signal
5,6
5,3
5,1
4,9
4,7
4,5
4,3
4,1
3,9
3,7
3,5
3,3
3,1
2,9
2,7
2,5
9,8
9
9,2
9,4
9,6
9,8
10
10,2
10,4
10,6
10,8
11
11,2
PPi M
Log (signal)/ Concentration PPi

FIGURE 3

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

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

2674254

N° d'enregistrement national

FR 9103398
FA 454272

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
Y	WO-A-8 909 283 (E. D. HYMAN) * abrégé * * page 1 - page 2 *	1,2,7-11
Y	WO-A-9 012 111 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) * le document en entier *	1,2,7-11

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

C12Q

Date d'achèvement de la recherche: 03 DECEMBRE 1991

Examinateur: MOLINA GALAN E.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)