

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 05.09.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 07.03.03 Bulletin 03/10.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX
DE PARIS Etablissement public — FR.

⑦② Inventeur(s) : EMILE JEAN FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BREMA.

⑤④ NOUVEAU PROCÉDE DE DETECTION D'UNE MUTATION EN PHASE DE LECTURE DANS UNE SEQUENCE
CODANTE ET APPAREIL POUR SA MISE EN OEUVRE.

⑤⑦ L'invention concerne un procédé de détection d'une
mutation d'une séquence codante d'ADN contenu dans un
échantillon, ce procédé comprenant au moins des étapes

- d'amplification par PCR avec marquage fluorescent,
- de séparation des produits d'amplification par électro-
phorèse,
- d'excitation de la fluorescence et
- de transformation du signal de référence en un graphe.

Ce procédé est caractérisé en ce qu'on sépare les pro-
duits d'amplification par électrophorèse capillaire, en ce
qu'on détermine à partir du graphe le nombre N de pics, en
ce que si le nombre N de pics est supérieur ou égal à 2, on
détermine la différence D de taille entre deux produits d'am-
plification correspondant respectivement à un pic, et en ce
que si la différence D est un multiple de 3, on confirme la
présence d'au moins un brin d'acide nucléique mutant dans
l'échantillon.

Application: mutation exon 11 du gène KIT.

FR 2 829 154 - A1



5

10

15 Nouveau procédé de détection d'une mutation en phase de
lecture dans une séquence codante et appareil pour sa mise
en oeuvre

La présente invention concerne un nouveau procédé de
20 détection d'une mutation en phase de lecture dans une
séquence codante d'au moins un brin d'acide nucléique, de
préférence de l'ADN, contenu dans un échantillon, ce
procédé comprenant au moins des étapes

- d'amplification par PCR du ou des brin(s) d'acide
25 nucléique contenu(s) dans l'échantillon, les produits
d'amplification incorporant au moins un composé
fluorescent,

- de séparation des produits d'amplification par
électrophorèse,

30 - d'excitation de la fluorescence par faisceau laser et
- de transformation du signal de référence en un graphe
dans lequel au moins une partie des pics correspond à la
taille, exprimée en nombre de bases nucléotidiques, d'un
produit d'amplification, ainsi qu'un appareil pour la mise
35 en oeuvre d'un tel procédé.

La détection de mutation sur des fragments d'ADN est une
préoccupation constante depuis de nombreuses années. Ainsi,

le brevet EP-A-0.648.844 décrit un procédé d'analyse de fragments d'ADN par séquençage des bases des fragments en vue d'obtenir, par comparaison des graphes, une information relative à la présence ou à l'absence de mutation. La
5 nécessité d'obtenir dans ce procédé au moins quatre courbes, chaque courbe correspondant à la distribution d'un type de nucléotide (ATGC) dans le fragment est une méthode longue et fastidieuse.

10 Un autre procédé pour déterminer l'existence d'une mutation est décrit dans le brevet WO 97/17464. Ce procédé nécessite de disposer dans l'échantillon de la séquence type sauvage et de la séquence mutée pour pouvoir comparer les deux pics obtenus. Par ailleurs, l'étape de séparation des produits
15 d'amplification s'effectue par électrophorèse sur gel, ce qui limite la précision de la résolution à plus ou moins deux bases de telle sorte que des faux positifs peuvent apparaître.

20 Un but de la présente invention est de proposer un nouveau procédé de détection de mutation par analyse de taille de fragment, ce procédé permettant d'éliminer de manière sûre les faux positifs.

25 Un autre but de la présente invention est de proposer un procédé permettant de détecter des mutants sans connaissance de la taille exacte du fragment de brin sauvage ou de référence dont une mutation est recherchée.

30 Un autre but de la présente invention est de proposer un procédé du type précité permettant une mise en oeuvre rapide dans le cadre d'analyse de routine pour la détection de mutations multiples ou de mutations dont la localisation est connue mais dont la nature est variable d'un patient à
35 un autre.

Un autre but de la présente invention est de proposer un procédé du type précité dont la mise en oeuvre permet de

confirmer, à un moindre coût, l'intérêt d'une prescription médicamenteuse.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé de
5 détection d'une mutation (délétion ou insertion) en phase
de lecture dans une séquence codante d'au moins un brin
d'acide nucléique, de préférence de l'ADN, contenu dans un
échantillon, ce procédé comprenant au moins des étapes
- d'amplification par PCR du ou des brin(s) d'acide
10 nucléique contenu(s) dans l'échantillon, les produits
d'amplification incorporant au moins un composé
fluorescent,
- de séparation des produits d'amplification par
électrophorèse,
15 - d'excitation de la fluorescence par faisceau laser et
- de transformation du signal de référence en un graphe
dans lequel au moins une partie des pics correspond à la
taille exprimée en nombre de bases nucléotidiques d'un
produit d'amplification,
20 caractérisé en ce qu'on sépare les produits d'amplification
par électrophorèse capillaire, en ce qu'on détermine à
partir du graphe le nombre N de pics, en ce que si le
nombre N de pics est supérieur ou égal à 2, on détermine la
différence D de taille entre deux produits d'amplification
25 correspondant respectivement à un pic et en ce que si la
différence D est un multiple de 3, on confirme la présence
d'au moins un brin d'acide nucléique mutant dans
l'échantillon, la mutation respectant le cadre de lecture
de l'ADN et correspondant soit à une insertion soit à une
30 délétion.

L'invention a encore pour objet un appareil pour la mise en
oeuvre d'un procédé de détection d'une mutation en phase de
lecture du type précité, cet appareil comprenant des moyens
35 de séparation des produits d'amplification par
électrophorèse, des moyens d'excitation de la fluorescence
par faisceau laser et des moyens d'analyse du signal de
fluorescence en vue de la transformation du signal de

fluorescence en un graphe dans lequel chaque sommet de pic correspond à la taille exprimée en nombre de bases nucléotidiques d'un produit d'amplification, caractérisé en ce que les moyens de séparation des produits d'amplification sont des moyens de séparation par électrophorèse capillaire et en ce que les moyens d'analyse incluent des premiers moyens de calcul du nombre de pics et des seconds moyens de calcul et d'analyse de l'écart entre deux pics, ces seconds moyens de calcul étant activables lorsque le nombre de pics est supérieur à 1.

L'invention a encore pour objet une utilisation d'un procédé de détection d'une mutation en phase de lecture dans l'exon 11 du gène KIT d'un échantillon mis en oeuvre en tant qu'agent de détermination de l'administration du médicament Glivec (marque déposée) (Imatinib) ou d'un autre inhibiteur de l'activité de c-kit pour le traitement de tumeurs stromales gastro-intestinales ou de sarcomes ou de carcinomes.

20

L'invention sera bien comprise à la lecture de la description suivante d'exemples de réalisation, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

la figure 1 représente un graphe obtenu à partir de l'analyse de taille de fragment d'acide nucléique d'un échantillon dans lequel aucune mutation n'est présente et

la figure 2 représente un graphe obtenu à partir de l'analyse d'un échantillon dans lequel le brin sauvage et le brin mutant sont présents, la mutation correspondant à une délétion de six paires de bases.

Il est à noter que pour chaque graphe ci-dessus l'abscisse correspond au nombre de bases nucléotidiques et l'ordonnée à l'intensité du signal de fluorescent.

Comme mentionné ci-dessus, le procédé de détection d'une mutation par analyse de taille de fragment est plus particulièrement destiné à être mis en oeuvre dans le cadre d'analyses de routine en vue de détecter rapidement la présence d'un brin d'acide nucléique mutant dans un échantillon sans avoir besoin de connaître la localisation exacte de cette mutation.

Dans l'exemple qui suit, ce procédé est mis en oeuvre en vue de la détection de délétion ou d'insertion de l'exon 11 du gène KIT dans des échantillons de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) fixes et incluses en paraffine. Bien évidemment, le procédé de détection peut s'appliquer à tout autre type de gène. Dans cette pathologie, les mutations sont des délétions de 3 à 54 paires de bases localisées sur un segment d'environ 150 paires de bases. Les mutations de l'exon 11 de KIT dans les GIST sont présentes dans environ 50 % des formes malignes et sont un facteur de mauvais pronostic. Les GIST métastasées sont actuellement incurables. Parallèlement, un nouveau médicament, le Glivec (marque déposée) (Imatinib) a été développé par la Société Novartis pour le traitement de telles tumeurs. Or, il a été rapporté que la présence de ces mutations est associée à 80 % de bonnes réponses au Glivec (marque déposée) alors que seulement 20 % des patients non mutés répondent à ce traitement. La mise en évidence de cette mutation a donc un intérêt clinique évident.

L'ADN extrait d'un prélèvement tumoral contient souvent des fragments de séquence de référence connus. S'il existe une mutation d'un gène d'intérêt, cette mutation peut être difficile à détecter puis à caractériser car elle peut exister à l'état hétérozygote au sein des cellules tumorales et le stroma tumoral peut contenir beaucoup de cellules non tumorales donc non mutées. Toutefois, le procédé objet de l'invention permet la détection de brins mutants y compris dans le cas où les brins mutants sont

présents en faible quantité dans l'échantillon.

L'ADN tumoral est généralement obtenu à partir d'échantillon L'échantillon est ici constitué d'ADN humain
5 extrait d'une tumeur gastro-intestinale ou d'un sarcome d'autre localisation, la séquence codante cible d'acide nucléique dont la mutation est recherchée étant constituée par l'exon 11 du gène KIT.

10 L'analyse d'un tel échantillon de matériel biologique nécessite une première étape d'extraction des acides nucléiques. Il existe de nombreuses techniques d'extraction qui permettent d'obtenir des acides nucléiques dont le degré de pureté est très variable. Ainsi, à titre
15 d'exemple, pour l'échantillon d'ADN tumoral obtenu ci-dessus, huit sections de 4 μ m ont été soumises à une digestion de protéinase K pendant 3 heures dans un tampon à pH 8 et l'ADN a été purifié sur des colonnes d'affinité (D-Genos, France), conformément aux instructions du fabricant.

20 L'élution d'ADN a été réalisée avec 80 ml d'eau distillée. Cette technique de purification est plus particulièrement décrite dans le brevet FR-A-2.733.754. Cette étape d'extraction est suivie d'une étape d'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) ou réaction en chaîne par
25 polymérase du ou des brins d'acide nucléique contenus dans l'échantillon. Au cours de cette étape d'amplification, on incorpore au moins un composé fluorescent. Ainsi, généralement, on réalise la PCR au moyen d'amorces oligonucléotidiques et de désoxynucléotides
30 triphosphates(dNTP) pour l'amplification, lesdites amorces étant aptes à s'hybrider avec chacun des deux brins de la séquence cible dont une mutation est recherchée. Les amorces et/ou les dNTP contiennent au moins un composé fluorescent incorporé. Dans l'exemple ci-dessous, les
35 composés fluorescents ont été incorporés aux amorces. L'amplification par PCR de l'exon 11 du gène KIT est ainsi réalisée avec des amorces localisées dans l'intron en amont (kit-11A : 5'-CAGGTAACCATTAT-3') ou en aval (kit-11B : 5'-

7

TCATTGTTTCAGGTGGAAC-3' et kit-11D : 5'-
 GTTATGTGTACCCAAAAAGG-3') de l'exon 11.

Les amorces non modifiées kit-11A, kit -11B et kit -11D,
 5 ainsi que le kit 11-A marqué en 5' avec FAM, qui constitue
 un composé fluorescent, sont disponibles auprès de la
 Société Eurogentec (Herstal, Belgique). Pour chaque
 amplification, 4 µl de l'échantillon d'ADN dans un total de
 mélange de réaction de PCR de 50 µl ont été soumis à 40
 10 cycles d'amplification par PCR en utilisant une Taq
 polymérase portant la référence Quantum Taq DNA polymerase
 (Appligene) dans un thermocycler Perkin Elmer (Gene Amp PCR
 xx 2400, Perkin Elmer, Norwalk, CT). Les concentrations
 respectives de chaque produit à l'intérieur du mélange de
 15 réaction PCR sont dNTP : 0,04 mM, amorces : 0,2 mM,
 formamide : 5 %, Taq ADN polymerase : 50 U/ml, tampon de
 Taq ADN polymerase (Appligene) : x 1. Chaque cycle PCR a
 été constitué d'une dénaturation pendant 1 minute à 92°C,
 d'un appariement pendant 30 secondes à 50°C et d'une
 20 élongation pendant 45 secondes à 72°C. Pour chaque
 amplification par PCR, une étape initiale de 2 minutes à
 94°C et une période finale de 7 minutes à 72°C ont été
 observées.

25 Les produits d'amplification ainsi obtenus sont séparés par
 électrophorèse. De manière caractéristique à l'invention,
 l'électrophorèse est une électrophorèse capillaire réalisée
 au moyen de dispositifs connus tels que l'analyseur
 génétique ABI Prism 310 (Applied Biosystems) et ce
 30 conformément aux instructions du fabricant. Pour détecter
 et déterminer la taille des fragments, des témoins de
 marquage ont été ajoutés à l'échantillon. Sur le graphe
 obtenu après électrophorèse, ces éléments de marquage
 apparaissent généralement sous forme d'une courbe d'une
 35 couleur différente. Dans les graphes représentés aux
 figures 1 et 2, les pics correspondant aux éléments de
 marquage portent la référence TM.

Dans les produits d'identification obtenus, les produits détectés seront ceux incorporant un composé fluorescent introduit par l'intermédiaire de l'amorce 5' FAM-kit A, FAM correspondant à un composé fluorescent. Il est à noter que, en tant que composé fluorescent, de nombreux produits peuvent être utilisés et sont aujourd'hui disponibles sur le marché. Ainsi, à titre d'exemple, l'étape de séparation des produits par électrophorèse capillaire peut s'effectuer comme suit : à 1 μ l de chaque échantillon ont été ajoutés 23 μ l de formamide et 0,5 μ l de marqueur de taille de référence GeneScan 500 Tamra de taille standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'échantillon ainsi obtenu est analysé dans un analyseur ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

15

Les courbes de fluorescence sont ensuite analysées avec un logiciel GeneScan (Applied Biosystems).

Pour chaque échantillon, la PCR a été faite avec les amorces kit-11D et kit-11A marquée avec FAM. Les graphes obtenus peuvent être ainsi conformes, en fonction de l'échantillon, aux graphes représentés aux figures 1 et 2.

Conformément au procédé, on détermine alors à partir du graphe le nombre N de pics, au moins une partie des pics correspondant à la taille exprimée en nombre de bases nucléotidiques d'un produit d'amplification. Le logiciel permet en effet d'introduire une échelle indiquant pour chaque pic la taille du fragment concerné. Si le nombre de pic est supérieur ou égal à 2, comme l'illustre la figure 2, on détermine la différence D de taille entre deux produits d'amplification correspondant respectivement à un pic et si la différence D obtenue est un multiple de 3, on confirme la présence d'au moins un brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon, la mutation respectant le cadre de lecture de l'ADN et correspondant soit à une insertion soit à une délétion. Ainsi, dans l'exemple représenté à la figure 2, on constate l'existence de deux pics, la

différence D est égale à
ce qui confirme la présence d'un brin mutant. La mutation
correspond à une insertion de bases.

- 5 La détermination du nombre de pics peut s'effectuer suivant divers procédés. Ainsi, on peut déterminer visuellement le nombre de pics et calculer mentalement la différence D et la nature de cette différence.
- 10 Il est également possible d'effectuer les opérations précitées au moyen d'un logiciel approprié. Pour ce faire, dans un premier, on détermine par calcul le nombre de pics en comparant les valeurs des ordonnées des points de mesure du graphe par série d'au moins trois points de mesure
- 15 successifs et en sélectionnant les points dont l'ordonnée est d'une part supérieure à une valeur seuil, d'autre part supérieure à l'ordonnée du point de mesure immédiatement en amont et du point de mesure immédiatement en aval et en ce que, dans un second temps, si le nombre de points
- 20 sélectionné est supérieur ou égal à deux, on détermine par calcul, à partir des abscisses des points sélectionnés, la différence D et sa nature. Ainsi, la comparaison des valeurs des ordonnées permet de déterminer les points de mesure du graphe correspondant à chaque sommet de pic. Par
- 25 la suite, il suffit, à partir des abscisses de chaque point sélectionné, de calculer la différence entre deux abscisses et de vérifier que cette différence est un multiple de 3. Toutes ces opérations peuvent être faites au moyen d'un appareil du type précité dans lequel les moyens d'analyse
- 30 du signal de fluorescence en vue de la transformation du signal de fluorescence en un graphe sont complétés de manière à inclure des premiers moyens de calcul du nombre de pics et des seconds moyens de calcul et d'analyse de l'écart entre deux pics, ces seconds moyens de calcul étant
- 35 activables lorsque le nombre de pics est supérieur à 1. Ainsi, les premiers moyens de calcul incluent des moyens de comparaison des valeurs des ordonnées des points du graphe par série d'au moins trois points de mesure successifs et

des moyens de sélection des points dont l'ordonnée est d'une part supérieure à une valeur seuil, d'autre part supérieure à l'ordonnée du point de mesure immédiatement en amont et à celle du point de mesure immédiatement en aval.

- 5 Les seconds moyens de calcul comportent quant à eux des moyens de calcul de la différence des abscisses de points de mesure sélectionnés par les premiers moyens de calcul, des moyens de division du résultat obtenu et des moyens de comparaison du reste de la division avec une valeur nulle
- 10 pour confirmer si la comparaison est positive, c'est-à-dire si le reste est égal à zéro, la présence d'un brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon.

Par ailleurs, grâce à un tel procédé, si le nombre de pics

15 est égal à 1, on compare alors la taille du produit d'amplification correspondant au pic visualisé avec la taille déduite de la séquence connue de référence correspondant au brin sauvage d'acide nucléique dont une mutation est recherchée (taille égale à 270 paires de bases

20 dans l'exemple présenté). Si la comparaison révèle une identité des tailles, on confirme l'absence de brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon. Il est donc possible, grâce à ce procédé, et dans le cas où la taille exacte de la séquence de référence est connue, de conclure à

25 l'absence de mutant dans l'échantillon. Contrairement à ce qui est décrit pour d'autres procédés (tels le WO 97/17464), il n'est pas nécessaire, ici, de disposer du graphe d'un échantillon de référence.

- 30 Dans les cas exceptionnels où un seul pic est détecté mais ne correspond pas à la taille de la séquence référence ou dans le cas où deux pics sont détectés mais la différence entre leur deux tailles n'est pas un multiple de 3, il convient alors de refaire la PCR après contrôle de
- 35 l'ensemble des conditions de travail.

En outre, si le nombre de pics est égal à 0, on soumet à nouveau l'échantillon à l'ensemble des étapes du procédé.

Dans ce cas, la PCR réalisée n'est pas strictement identique à la PCR mentionnée ci-dessus. En effet, pour ces échantillons, une première PCR est effectuée avec les amorces kit-11A non marquée et kit-11B. Les produits de PCR
5 sont ensuite purifiés avec une colonne (Qiaquick purification PCR kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). Les produits sont repris dans un volume final de 30 μ l. Une seconde PCR est pratiquée avec 4 μ l de ces produits en présence des amorces kit-11A marquée par FAM et kit-11D.
10 Les produits d'amplification sont analysés sur l'ABI Prism 310 :

. Si plus d'un pic est détecté et que la différence entre la taille des deux pics est un multiple de 3, on peut conclure à la présence d'un mutant au sein de l'échantillon
15 analysé ;

. Si un seul pic est détecté et que la taille de ce pic est de 270 nucléotides, qui correspondent à la séquence à brin sauvage de l'exon 11, on peut conclure à l'absence de mutation ;

20 . Si aucun pic n'est détecté, on peut conclure que l'ADN n'est pas analysable par cette technique. Il peut alors être utile de refaire une extraction.

. Dans des cas exceptionnels, un seul pic est détecté mais sa taille est anormale ou deux pics sont détectés mais la
25 différence entre leur deux tailles n'est pas un multiple de trois. Dans ces cas, les deux PCR doivent être refaites après contrôle de l'ensemble des conditions de travail.

Bien évidemment, une fois que le procédé précité a permis
30 la mise en évidence de la présence d'un brin mutant dans l'échantillon, il peut alors être procédé à un séquençage de ce brin de manière à déterminer la nature exacte de la mutation détectée.

35 Le procédé décrit ci-dessus permet de traiter en un temps court un grand nombre d'échantillons. Ce qui permet, pour tous les échantillons dans lesquels une absence de mutation a été détectée, d'éviter toute opération de séquençage

complet des fragments d'acide nucléique contenus dans ces échantillons.

De la même manière, dans le cas d'échantillons où la
5 présence d'un brin mutant a été détectée, il n'est pas
nécessaire de procéder à un séquençage complet, en
particulier dans le cas où ce procédé est mis en oeuvre
pour confirmer l'intérêt d'une prescription thérapeutique,
en particulier dans le cas du médicament décrit ci-dessus
10 où le seul fait de connaître l'existence d'une mutation de
l'exon 11 du gène KIT permet de confirmer l'efficacité de
ce médicament.

REVENDECATIONS

1. Procédé de détection d'une mutation en phase de lecture dans une séquence codante d'au moins un brin d'acide
5 nucléique, de préférence de l'ADN, contenu dans un échantillon, ce procédé comprenant au moins des étapes
- d'amplification par PCR du ou des brin(s) d'acide nucléique contenu(s) dans l'échantillon, les produits d'amplification incorporant au moins un composé
10 fluorescent,
- de séparation des produits d'amplification par électrophorèse,
- d'excitation de la fluorescence par faisceau laser et
- de transformation du signal de référence en un graphe
15 dans lequel au moins une partie des pics correspond à la taille exprimée en nombre de bases nucléotidiques d'un produit d'amplification,
caractérisé en ce qu'on sépare les produits d'amplification par électrophorèse capillaire, en ce qu'on détermine à
20 partir du graphe le nombre N de pics, en ce que si le nombre N de pics est supérieur ou égal à 2, on détermine la différence D de taille entre deux produits d'amplification correspondant respectivement à un pic et en ce que si la différence D est un multiple de 3, on confirme la présence
25 d'au moins un brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon, la mutation respectant le cadre de lecture de l'ADN et correspondant soit à une insertion soit à une délétion.

30 2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on détermine visuellement le nombre de pics.

3. Procédé de détection selon la revendication 1,
35 caractérisé en ce que, dans un premier temps, on détermine par calcul le nombre de pics en comparant les valeurs des ordonnées des points de mesure du graphe par série d'au moins trois points de mesure successifs et en sélectionnant

les points dont l'ordonnée est d'une part supérieure à une valeur seuil, d'autre part supérieure à l'ordonnée du point de mesure immédiatement en amont et du point de mesure immédiatement en aval et en ce que, dans un second temps, si le nombre de points sélectionné est supérieur ou égal à deux, on détermine par calcul, à partir des abscisses des points sélectionnés, la différence D et sa nature.

4. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 3,

caractérisé en ce que si N est égal à 1, on compare la taille du produit d'amplification correspondant au pic visualisé avec la taille déduite de la séquence connue de référence correspondant au brin sauvage d'acide nucléique dont une mutation est recherchée et en ce que, si la comparaison révèle une identité des tailles, on confirme l'absence de brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon.

5 Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 3,

caractérisé en ce que si N est égal à 0, on soumet à nouveau l'échantillon à l'ensemble des étapes du procédé.

6. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 5,

caractérisé en ce qu'on réalise la PCR au moyen d'amorces oligonucléotidiques et de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) pour l'amplification, lesdites amorces étant aptes à s'hybrider avec chacun des deux brins de la séquence cible dont une mutation est recherchée et en ce qu'on incorpore dans les amorces et/ou les dNTP au moins un composé fluorescent.

7 Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 6,

caractérisé en ce que l'échantillon est constitué d'ADN humain extrait d'une tumeur gastro-intestinale ou d'un

sarcome d'autre localisation, la séquence codante cible d'acide nucléique dont la mutation est recherchée étant constituée par l'exon 11 du gène KIT.

- 5 8 Appareil pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection d'une mutation en phase de lecture conforme à l'une des revendications 1 à 7, cet appareil comprenant des moyens de séparation des produits d'amplification par électrophorèse, des moyens d'excitation de la fluorescence par faisceau
10 laser et des moyens d'analyse du signal de fluorescence en vue de la transformation du signal de fluorescence en un graphe dans lequel chaque sommet de pic correspond à la taille exprimée en nombre de base nucléotidique d'un produit d'amplification,
15 caractérisé en ce que les moyens de séparation des produits d'amplification sont des moyens de séparation par électrophorèse capillaire et en ce que les moyens d'analyse incluent des premiers moyens de calcul du nombre de pics et des seconds moyens de calcul et d'analyse de l'écart entre
20 deux pics, ces seconds moyens de calcul étant activables lorsque le nombre de pics est supérieur à 1.

9. Appareil selon la revendication 8,
caractérisé en ce que les premiers moyens de calcul
25 incluent des moyens de comparaison des valeurs des ordonnées des points du graphe par série d'au moins trois points de mesure successifs et des moyens de sélection des points dont l'ordonnée est d'une part supérieure à une valeur seuil, d'autre part supérieure à l'ordonnée du point
30 de mesure immédiatement en amont et à celle du point de mesure immédiatement en aval.

10. Appareil selon l'une des revendications 8 et 9,
caractérisé en ce que les seconds moyens de calcul
35 comportent des moyens de calcul de la différence des abscisses de points de mesure sélectionnés par les premiers moyens de calcul, des moyens de division du résultat obtenu et des moyens de comparaison du reste de la division avec

une valeur nulle pour confirmer si la comparaison est positive, la présence d'un brin d'acide nucléique mutant dans l'échantillon.

- 5 11. Utilisation d'un procédé de détection d'une délétion ou
insertion en phase de lecture dans l'exon 11 du gène KIT
d'un échantillon conforme à l'une des revendications 1 à 7
mis en oeuvre en tant qu'agent de détermination de
l'administration du médicament Glivec (marque déposée)
10 (Imatinib) ou d'un autre inhibiteur de l'activité de c-kit
pour le traitement de tumeurs stromales gastro-intestinales
ou de sarcomes ou de carcinomes.

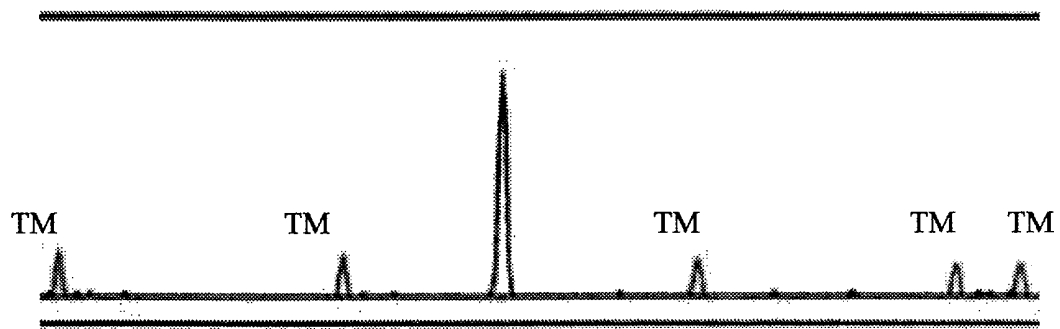


Figure 1

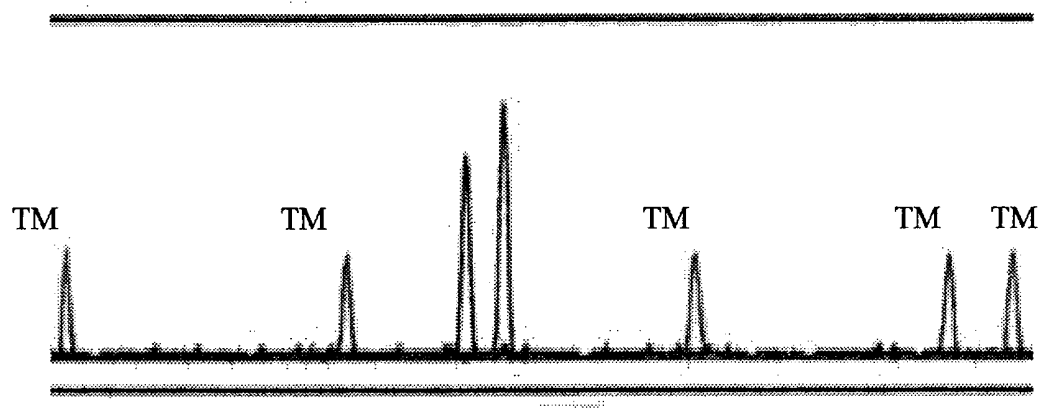


Figure 2

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 613530
FR 0111474

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 97 17467 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;NORBERG TORBJOERN (SE)) 15 mai 1997 (1997-05-15) * page 4, ligne 8 - page 5, ligne 18; revendication 1 *	1,8,11	C12Q1/68
A	US 5 683 880 A (KAMB ALEXANDER) 4 novembre 1997 (1997-11-04) * abrégé *	1	
D,A	EP 0 648 844 A (HITACHI ELECTR ENG) 19 avril 1995 (1995-04-19) * abrégé; figure 1 *	1	
A	WO 00 00637 A (VISIBLE GENETICS INC) 6 janvier 2000 (2000-01-06) * revendications 1,7 *	1	
A	US 5 814 491 A (LI DAIZONG ET AL) 29 septembre 1998 (1998-09-29) * revendication 1 *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12Q G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 juin 2002		Duchatellier, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire 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			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111474 FA 613530**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **26-06-2002**

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

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9717467	A	15-05-1997	CA	2237156 A1	15-05-1997
			EP	0859864 A1	26-08-1998
			JP	2000500008 T	11-01-2000
			WO	9717467 A1	15-05-1997
			US	6291167 B1	18-09-2001
US 5683880	A	04-11-1997	AUCUN		
EP 0648844	A	19-04-1995	JP	7092163 A	07-04-1995
			EP	0648844 A2	19-04-1995
WO 0000637	A	06-01-2000	AU	4355899 A	17-01-2000
			CA	2321821 A1	06-01-2000
			WO	0000637 A2	06-01-2000
			EP	1088103 A2	04-04-2001
			US	6404907 B1	11-06-2002
US 5814491	A	29-09-1998	AU	699613 B2	10-12-1998
			AU	5775596 A	24-12-1996
			CA	2223061 A1	12-12-1996
			CN	1198188 A	04-11-1998
			DE	69617274 D1	03-01-2002
			EP	0873419 A1	28-10-1998
			WO	9639535 A1	12-12-1996
			JP	11506916 T	22-06-1999