



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/31, C07H 21/04 C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 91/03558 (43) Date de publication internationale: 21 mars 1991 (21.03.91)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00591 (22) Date de dépôt international: 6 septembre 1990 (06.09.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/11665 6 septembre 1989 (06.09.89) FR 90/02676 2 mars 1990 (02.03.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : GUESDON, Jean-Luc [FR/FR]; 12, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). THIERRY, Dominique [FR/FR]; 4, rue des Longs-Prés, F-92100 Boulogne (FR). ULLMANN, Agnès [FR/FR]; 3, rue Paul-Dupuy, F-75016 Paris (FR). GICQUEL, Brigitte [FR/FR]; 8, rue Daguerre, F-75014 Paris (FR). BRISSON-NOËL, Anne [FR/FR]; 151, rue L.M.-Nordmann, F-75013 Paris (FR).</p>		<p>(74) Mandataires: ORES, Irène etc. ; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>

(54) Title: FRAGMENTS OF NUCLEIC ACIDS DERIVED FROM AN APPROPRIATE MYCOBACTERIA GENOME, THEIR APPLICATIONS IN THE DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIA INFECTIONS AND PLASMIDES CONTAINING SAID FRAGMENTS

(54) Titre: FRAGMENTS D'ACIDES NUCLEIQUES DERIVES D'UN GENOME DE MYCOBACTERIE APPROPRIEE, LEURS APPLICATIONS DANS LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A MYCOBACTERIES ET PLASMIDES CONTENANT LESDITS FRAGMENTS

(57) Abstract

Fragments of nucleic acids derived from an appropriate mycobacteria genome, particularly *Mycobacterium tuberculosis*, their applications in the diagnosis of mycobacteria infections, as well as plasmides containing said fragments. The nucleotidic sequence is comprised of a nucleotidic sequence repeated in the genome of a mycobacterium and specific of the bacillus of tuberculosis and is characterized by a strong hybridation with *M. tuberculosis*.

(57) Abrégé

Fragments d'acides nucléiques, dérivés d'un génome de mycobactérie appropriée, notamment de *Mycobacterium tuberculosis*, leurs applications dans le diagnostic des infections à mycobactéries, ainsi que des plasmides contenant lesdits fragments. La séquence nucléotidique est constituée par une séquence nucléotidique répétée dans le génome d'une mycobactérie et spécifique du groupe du bacille de la tuberculose et en ce qu'elle s'hybride très fortement avec *M. tuberculosis*.

11	21	31	41	51	61
71	81	91	101	111	121
131	141	151	161	171	181
191	201	211	221	231	241
251	261	271	281	291	301
311	321	331	341	351	361
371	381	391	401	411	421
431	441	451	461	471	481
491	501	511	521	531	541
551	561	571	581	591	601
611	621	631	641	651	661
671	681	691	701	711	721
731	741	751	761	771	781
791	801	811	821	831	841
851	861	871	881	891	901
911	921	931	941	951	961
971	981	991	1001	1011	1021
1031	1041	1051	1061	1071	1081
1091	1101	1111	1121	1131	1141
1151	1161	1171	1181	1191	1201
1211	1221	1231	1241	1251	1261
1271	1281	1291	1301	1311	1321
1331	1341	1351	1361	1371	1381
1391	1401	1411	1421	1431	1441
1451	1461	1471	1481	1491	1501
1511	1521	1531	1541	1551	1561
1571	1581	1591	1601	1611	1621
1631	1641	1651	1661	1671	1681
1691	1701	1711	1721	1731	1741
1751	1761	1771	1781	1791	1801
1811	1821	1831	1841	1851	1861
1871	1881	1891	1901	1911	1921
1931	1941	1951	1961	1971	1981
1991	2001	2011	2021	2031	2041

* Voir au verso

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	PL	Pologne
CA	Canada	JP	Japon	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DK	Danemark			TG	Togo
				US	Etats-Unis d'Amérique

FRAGMENTS D'ACIDES NUCLEIQUES DERIVES D'UN GENOME DE
MYCOBACTERIE APPROPRIEE, LEURS APPLICATIONS DANS LE
DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A MYCOBACTERIES ET PLASMIDES
CONTENANT LESDITS FRAGMENTS

5 La présente Invention est relative à des fragments d'acides nucléiques, dérivés d'un génome de mycobactérie appropriée, notamment de *Mycobacterium tuberculosis*, à leurs applications dans le diagnostic des infections à mycobactéries, ainsi qu'à des plasmides contenant lesdits fragments.

Les mycobactéries correspondent au genre *Mycobacterium* qui comprend au moins 54 espèces différentes.

Parmi celles-ci environ 10 sont pathogènes ou opportunistes pour l'homme ou l'animal. Deux d'entre-elles, *M. tuberculosis* et *M. leprae* sont respectivement les agents de la tuberculose et de la lèpre.

Il est connu que ces deux maladies représentent un problème majeur de Santé Publique ; en effet, il existe actuellement entre 15 et 60 millions d'individus atteints de tuberculose dans le Monde et 2 à 3 millions de personnes meurent chaque année à cause de cette infection. Dans les pays développés, *M. tuberculosis* est la cause la plus commune des infections mycobactériennes. En France, il apparaît environ 10^4 nouveaux cas de tuberculose par an. La vaccination par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin, une souche atténuée de *M. bovis*) est loin d'être efficace au sein de toutes les populations. Cette efficacité varie environ de 80 % dans les pays occidentaux comme l'Angleterre, à 0 % en Inde (résultats du dernier essai de vaccination à Chingleput). De plus, l'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux anti-tuberculeux usuels et l'existence d'une corrélation entre tuberculose et SIDA ajoutent à l'urgence de mettre au point une méthode rapide de détection et d'identification des mycobactéries.

Par exemple, une étude épidémiologique réalisée en Floride a montré que 10 % des malades atteints de SIDA sont atteints de tuberculose au moment du diagnostic du SIDA ou 18 mois avant celui-ci. Chez ces malades, la tuberculose apparaît dans 60 % des cas sous une forme disséminée donc non repérable par les critères de diagnostic classiques comme la radiographie pulmonaire ou l'analyse de crachats.

Enfin, le diagnostic de la tuberculose et des autres mycobactérioses apparentées est difficile à réaliser pour différentes raisons : les maladies pulmonaires causées par différentes mycobactéries ne peuvent pas être distinguées cliniquement, radiologiquement ou histologiquement ; les mycobactéries sont souvent présentes en

faible quantité et lorsqu'elles sont en quantité détectable par les méthodes classiquement utilisées, la maladie est déjà en évolution et les malades sont contagieux pour leur entourage ; de plus, en raison du temps de génération très long de ces bactéries (24 h pour *M. tuberculosis* comparé à 20 min pour *E. coli*), la culture de ces organismes est difficile. Ainsi faut-il 6 à 8 semaines pour identifier les germes et davantage pour obtenir un antibiogramme utilisable pour le traitement adéquat des malades. Il est donc indispensable de pouvoir disposer d'un test de détection n'exigeant pas de culture des germes et directement utilisable avec les échantillons pathologiques, même lorsque les germes y sont présents à de faibles concentrations.

10 Plusieurs techniques sont actuellement utilisées en clinique, pour identifier une infection mycobactérienne.

Il faut tout d'abord citer la détection directe des microorganismes au microscope ; cette technique est rapide, mais ne permet pas l'identification de l'espèce mycobactérienne observée et manque de sensibilité dans la mesure où un grand nombre de microorganismes doit être présent dans l'échantillon ($> 10^4/\text{ml}$) pour permettre une détection fiable (BATES J., CHEST, 1979, 76, (suppl.), 757-763).

Les cultures, lorsqu'elles sont positives, ont une spécificité approchant 100 % et permettent l'identification de l'espèce mycobactérienne isolée ; néanmoins, comme précisé ci-dessus, la croissance des mycobactéries *in vitro* ne peut être réalisée qu'en 3 à 6 semaines et lorsque peu de mycobactéries sont présentes au site de l'infection, des cultures répétées sont nécessaires pour s'assurer d'un résultat positif (BATES J., 1979 et BATES J. et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1986, 134, 415-417).

Les techniques sérologiques peuvent s'avérer utiles dans certaines conditions, mais leur utilisation est limitée par leur sensibilité et/ou leur spécificité faibles (DANIEL T.M. et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1987, 135, 1137-1151).

La présence ou l'absence de mycobactéries peut également être déterminée par hybridation avec de l'ADN ou de l'ARN en utilisant des sondes spécifiques des séquences d'ADN (KIEHN T.E. et al., J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1551-1552 ; ROBERTS M.C. et al., J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1239-1243 ; DRAKE T.A. et al., J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1442-1445). Cependant, ces méthodes reposent sur le polymorphisme des séquences nucléotidiques des fragments utilisés ou sur le polymorphisme des régions avoisinantes et nécessitent également la culture des microorganismes.

Certaines séquences d'ADN de différentes mycobactéries et notamment certains gènes codant pour des antigènes mycobactériens ont été décrits. On peut

citer notamment la Demande Internationale PCT WO 88/00974, qui a pour Inventeur YOUNG R. et dont le contenu est repris dans un article paru dans Nature, 1985, 316, 450 ; ces publications décrivent les gènes codant pour cinq antigènes de *M. leprae* immunodominants et en particulier le gène codant pour l'antigène de 65 kDa a été séquencé. On peut également citer la Demande Internationale PCT WO 88/05823, qui a pour Co-Inventeurs HUSSON R., YOUNG R. et SHINNICK T. et dont le contenu est repris dans l'article paru dans J. Bact., 1987, 169, 1080-1088 et qui décrit les gènes de *M. tuberculosis* codant pour des antigènes protéiques et notamment pour l'antigène de 65 kDa. Cette Demande Internationale précise, en particulier, que les antigènes de *M. tuberculosis* codant pour cinq protéines immunologiquement actives ont été isolés par un criblage systématique d'une banque d'ADN recombinant exprimée dans un bactériophage lambda gt11, avec une collection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes protéiques de cette bactérie. L'un des antigènes de *M. tuberculosis*, une protéine 65 kDa, présente des déterminants communs à *M. tuberculosis* et *M. leprae*.

La Demande Internationale PCT WO 88/06591, qui a notamment pour Co-Inventeur T. SHINNICK, décrit une protéine recombinante de 540 acides aminés (protéine de 65 kDa) ainsi que la séquence d'ADN et les vecteurs d'expression de ladite protéine, et les applications de ladite protéine recombinée. Cette Demande décrit également des peptides correspondant à des séquences de cette protéine et leurs applications.

Les gènes codant pour les protéines d'autres mycobactéries (*M. africanum*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG et *M. avium*) ont également été isolés. On peut citer notamment THOLE et al. (Infect. Immunol., 1987, 55, 1466-1475), qui ont décrit une protéine de 64 kDa de *M. bovis* BCG exprimée dans *E. coli*.

Cependant, les quantités d'ADN mycobactérien présentes dans la plupart des échantillons biologiques sont insuffisantes pour donner un signal positif ; la technique d'hybridation s'est donc révélée inadaptée à la détection d'ADN mycobactérien extrait directement d'échantillons biologiques.

Un certain nombre d'études ont également montré une certaine homologie de structure entre les différentes mycobactéries. Cependant, des différences dans la séquence d'ADN de *M. tuberculosis* et *M. bovis* ont été décrites dans la région 3' du cadre ouvert de lecture de l'antigène 65 kDa (SHINNICK et al., 1987, THOLE et al., 1987), mais une région homologue n'a pas été observée dans l'ADN de

M. leprae (MEHRA et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 7013-7017, également PCT 88/000974).

Il existe également des publications qui ont mis en évidence l'existence de séquences répétées chez les mycobactéries ; on peut citer en particulier l'article au nom de K.D. EISENACH et al (J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 11, 2240-2245) qui décrit trois segments clonés d'ADN de *M. tuberculosis*, qui ont été identifiés par hybridation sélective avec de l'ADN de *M. bovis*. Ces trois segments recombinants, dénommés respectivement M13KE37 (790 paires de bases), M13KE49 (570 paires de bases) et M13KE115 (environ 1600 paires de bases) sont obtenus par clonage dans le bactériophage M13 de fragments d'ADN de *M. tuberculosis*. Toutefois, cet Article fait apparaître que la séquence nucléotidique des segments correspondants n'est pas connue de ses Auteurs.

On peut également citer l'article de D.M. COLLINS et al. (FEMS Microbiol. Letters, 1989, 60, 175-178), qui décrit l'identification d'une séquence d'ADN répétitive spécifique de *M. paratuberculosis*.

Il convient d'autre part de citer l'Article de REDDI et Al. (INTERNATIONAL JOURNAL OF LEPROSY, 1988, 56, N° 4, p. 592-598) qui décrit l'existence dans l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv et H37Ra, de fragments répétés dont la séquence n'a pas été déterminée. Les fragments répétés décrits par REDDI et Al., qui sont respectivement des fragments de 5, 6 et 4, 8 Kb, ne sont pas spécifiques du groupe des bacilles de la tuberculose puisqu'ils sont aussi présents chez *M. kansasii* qui n'appartient pas au complexe *tuberculosis*.

Les références complémentaires suivantes constituent également l'état de l'Art préalable à la présente Invention.

BAESS I., Acta Path. Microbiol. Scand., 1979, 87, 221-226 ;
BEAUCAGE S.L. et al., Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862 ; EISENACH K.D. et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1986, 133, 1065-1068 ; GHEORGHIU M. et al., J. Biol. Standardization, 1988, 16, 15-26 ; GLASSROTH J. et al., N. Engl. J. Med., 1980, 302, 1441-1450 ; HAWKINS C.C. et al., Ann. Intern. Med., 1985, 105, 184-188 ;
IMAEDA T., Int. J. Systematic Bacteriol., 1985, 35, 147-150 ; IMAEDA T. et al., Int. J. Systematic Bacteriol., 1988, 38, 151-156 ; KOGAN S.C. et al., N. Engl. J. Med., 1987, 317, 985-990 ; LI H. et al., Nature (Lond.), 1988, 335, 414-417 ; LU M.C. et al., Infect. Immun., 1987, 55, 2378-2382 ; MANIATIS T. et al., 1982, Cold Spring Harbor, New York ; McFADDEN J.J. et al., Mol. Microbiol., 1987, 1, 283-291 ; PAO C.C. et al., Tubercle, 1988, 69, 27-36 ; PATEL R., J. Gen. Microbiol., 1986, 132, 541-

551 ; SAIKI R.K. et al., Science, 1988, 239, 487-491 ; SANGER F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463-5467 ; SMIDA J. et al., Int. J. Leprosy, 1988, 56, 449-454 ; THEIN S.L. et al., in Human Genetic Diseases, 1986, IRL Press, 33-50 ; THOLE J.E.R. et al., Infect. Immun., 1985, 50, 800-806 ; WATSON E.A., Canad. J. Pub. Health, 1935, 26, 268-275 ; WOLINSKY E., Am. Rev. Respir. Dis, 1979, 119, 107-159.

Récemment un procédé de détection de faibles quantités de mycobactéries par amplification et hybridation directement sur des échantillons biologiques a été mis au point ; ledit procédé utilise le polymorphisme des séquences nucléotidiques d'un fragment de gène commun à toutes les mycobactéries, et notamment un fragment du gène codant pour la protéine 65 kD (Demande de Brevet français n° 89 05057).

Poursuivant les travaux sur les mycobactéries dans cette voie, les Inventeurs ont mis au point un procédé de détection spécifique et encore plus rapide car permettant d'identifier dans un échantillon biologique une mycobactérie d'un groupe donné en moins de 24 heures.

La présente Invention s'est, en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé de détection et/ou d'identification spécifique d'au moins un groupe de mycobactéries, notamment spécifique du groupe du bacille de la tuberculose permettant de détecter de faibles quantités d'ADN extrait des germes eux-mêmes en nombre restreint et de révéler la présence des mycobactéries du/des groupes à détecter directement dans les échantillons pathologiques.

C'est également un but de l'Invention de pourvoir à des réactifs de diagnostic spécifiques de groupe de mycobactéries et notamment du groupe du bacille de la tuberculose.

La présente Invention a pour objet une séquence nucléotidique issue de mycobactéries, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence nucléotidique répétée dans le génome d'une mycobactérie et spécifique du groupe du bacille de la tuberculose et en ce qu'elle s'hybride très fortement avec *M. tuberculosis*.

Dans la présente Invention, on appelle groupe du bacille de la tuberculose, le groupe qui comprend *M. bovis*-BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*.

On entend par séquence nucléotidique, dans la présente Invention, aussi bien une séquence d'ADN double brin, une séquence d'ADN simple brin que les produits de transcription desdites séquences.

On entend par forte hybridation, au sens de la présente Invention, une hybridation donnant un signal important lié au nombre de séquences répétées présentes sur l'ADN génomique ; un signal important permet d'obtenir une tache visible facilement à l'oeil nu après une autoradiographie d'une durée courte, réalisée dans les conditions définies à l'exemple 1 ci-après, notamment inférieure ou égale à une heure ; on obtient, par exemple, une tache très importante après une autoradiographie d'une heure environ, lorsque l'on utilise une sonde marquée ayant une activité spécifique voisine de 10^9 cpm par μg d'ADN, avec *M. tuberculosis*, alors que pour *M. bovis BCG*, on obtient un signal faible, et ce, seulement après un délai de 48 heures.

Selon un mode de réalisation préféré de ladite séquence, elle comporte à son extrémité 5' la séquence 5' TGAACCGCCCCGG 3' de formule I et à son extrémité 3' la séquence 5'CCGGGGCGGTTCA 3' de formule II, ladite séquence contenant en outre au moins un fragment d'une séquence de formule III suivante :

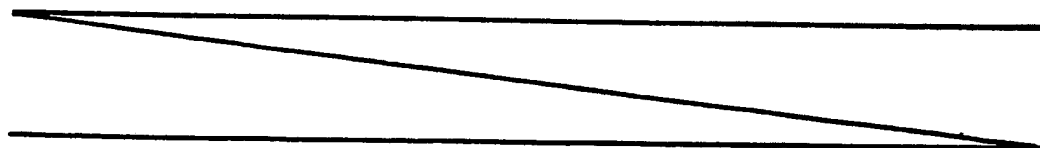
	10	20	30	40	50	60
15	GTCGACACGC	CTTCTGCACG	GGAAGTCCTT	CTGCGGCCAT	CGTTGCTATG	GCCGCTTACT
	70	80	90	100	110	120
	GCCTTCTAGT	CCGTGCGGCT	CTCGCAACAG	CTCACGGGAC	CTTTTTGAGG	ATCGCCACTT
	130	140	150	160	170	180
	CAGGTCTTCA	ACTCGCGGAT	GCCCTCATTG	GCAACGTTTG	CGCCCTGCCT	TGGGGCGGCC
20	190	200	210	220	230	240
	GGCAGCCACC	AAGTCGAGCA	CTTTGCGGCG	GAACTACTCG	GGGTAACACT	TCGGCAGGGA
	250	260	270	280	290	300
	CACGGCTCGT	TCGACGGACG	TCGTGACCAG	AAGTCGAGCA	AACCGACTCC	ACTCTAGCTA
	310	320	330	340	350	360
	GTGATAACAAG	CTTTTTTGTA	GCCGCGCGAT	GAACCGCCCC	GGCATGTCCG	GAGACTCCAG
25	370	380	390	400	410	420
	TTCTTGAAA	GGATGGGGTC	ATGTCAGGTG	GTTTCATCGAG	GAGGTACCCG	CCGGAGCTGC
	430	440	450	460	470	480
	GTGAGCCGGC	GGTGC GGATG	GTCGCAGAGA	TCCGCGGTCA	GCACGATTCG	GAGTGGGCAG
	490	500	510	520	530	540
30	CGATCAGTGA	GGTCGCCCGT	CTACTTGGTG	TTGGCTGCCG	GGAGACGGTG	CGTAAGTGGG
	550	560	570	580	590	600
	TGCGCCAGGC	GCAGGTCGAT	GCCGGCGCAC	GGCCCGGGAC	CACGACCGAA	GAATCCGCTG
	610	620	630	640	650	660
	AGCTGAAGCG	CTTAGCGGCG	GGACAACGCC	GAATTGCGAA	GGGCGAACGC	GATTTTAAAG
35	670	680	690	700	710	720
	ACCGCGTCGG	CTTCTTTCGC	GGCCGAGCTC	GACCGGCCAG	CACGCTAATT	AACGGTTCAT

	730	740	750	760	770	780
	CGCCGATCAT	CAGGGCCACC	GCGAGGGCCC	CGATGGTTTG	CGGTGGGGTG	TCGAGTCGAT
	790	800	810	820	830	840
	CTGCACACAG	CTGACCGAGC	TGGGTGTGCC	GATCGCCCCA	TCGACCTACT	ACGACCACAT
5	850	860	870	880	890	900
	EAACCGGGAG	CCCAGCCGCC	GCGAGCTGCG	CGATGGCGAA	CTCAAGGAGC	ACATCAGCCG
	910	920	930	940	950	960
	CGTCCACGCC	GCCAACTACG	GTGTTTACGG	TGCCCCGAAA	GTGTGGCTAA	CCCTGAACCG
	970	980	990	1000	1010	1020
10	TGAGGGCATC	GAGGTGGCCA	GATGCACCGT	CGAACGGCTG	ATGACCAAAC	TCGGCCTGTC
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	CGGGACCACC	CGCGGCAAAG	CCCCGAGGAC	CACGATCGCT	GATCCGGCCA	CAGCCCCTCC
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CGCCGATCTC	GTCCAGCGCC	GCTTCGGACC	ACCAGCACCT	AACCGGCTGT	GGGTAGCAGA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
15	CCTCACCTAT	GTGTCGACCT	GGGCAGGGTT	CGCCTACGTG	GCCTTTGTCA	CCGACGCCTA
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	CGCTCGCAGG	ATCCTGGGCT	GGCGGGTCGC	TTCCACGATG	GCCACCTCCA	TGGTCCTCGA
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	CGCGATCGAG	CAAGCCATCT	GGACCCGCCA	ACAAGAAGGC	GTACTCGACC	TGAAAGACGT
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
20	TATCCACCAT	ACGGATAGGG	GATCTCAGTA	CACATCGATC	CGGTTCAGCG	AGCGGCTCGC
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	CGAGGCAGGC	ATCCAACCGT	CGGTCCGAGC	GGTCCGAAGC	TCCTATGACA	ATGCACTAGC
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	CGAGACGATC	AACGGCCTAT	ACAAGACCGA	GCTGATCAA	CCCGGCAAGC	CCTGGCGGTC
25	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	CATCGAGGAT	GTCGAGTTGG	CCACCCGCGC	CTGGGTCGAC	TGGTTCAACC	ATCGCCGCCT
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CTACCACTAC	TGCGGCGACG	TCCCGCCGGT	CGAACTCGAG	GCTGCCTACT	ACGCTCAACG
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
30	CCAGAGACCA	GCCGCCGGCT	GAGGTCTCAG	ATCAGAGAGT	CTCCGGACTC	ACCGGGGCGG

TTCA

FORMULE III

35



Selon une modalité avantageuse de cette disposition, ladite séquence nucléotidique comprend les nucléotides 343-1152 de la séquence de formule III ci-dessus et les fragments de celle-ci, ainsi que les séquences qui présentent au moins 80 % d'homologie avec ladite séquence ou ses fragments.

5 Selon une autre modalité avantageuse de cette disposition, ladite séquence nucléotidique comprend les nucléotides 327-1684 de la séquence de formule III ci-dessus et les fragments de celle-ci, ainsi que les séquences qui présentent au moins 80 % d'homologie avec ladite séquence nucléotidique ou ses fragments. Cette dernière séquence a été dénommée IS6110 par les Inventeurs et comprend notamment
10 les sites de restriction suivants : Sa II, SmaI, KpnI, HindIII.

Le présente Invention englobe également des fragments nucléotidiques, notamment des oligonucléotides, dérivés des séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus, et notamment les oligonucléotides suivants, qui sont caractérisés en ce qu'ils présentent les séquences de formules IV à XIII et A à H ci-
15 après, qui sont en outre identifiées par les désignations qui leur ont été attribuées par les Inventeurs :

ISTB-1 : 5' ATGTCAGGTGGTTCATCGAG 3' (IV)
ISTB-2 : 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3' (V)
ISTB-3 : 5' TTCGCAATTCTGGCGTTGTCC 3' (VI)
20 ISTB-4 : 5' TCGACCTACTACGACCACAT 3' (VII)
ISTB-5 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' (VIII)
ISTB-6 : 5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3' (IX)
ISTB-7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3' (X)
ISTB-8 : 5' TGGCCAGATGCACCGTCGAA 3' (XI)
25 ISTB-9 : 5' AGTACACATCGATCCGGTTC 3' (XII)
ISTB-10 : 5' TACTACGCTCAACGCCAGAG 3' (XIII)
IS-2 : 5' CATCAGCCGCGTCCACGCCGCAACTACGG 3' (XIV)
IS-4 : 5' TGTGCCGATCGCCCCATCGACCTACTACGA 3' (XV)
IS-6 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAG 3' (XVI)

30 ainsi que les séquences qui présentent au moins 80 % d'homologie avec l'un ou l'autre de ces fragments.

L'Invention vise aussi des fragments nucléotidiques complémentaires des précédents, ainsi que des fragments modifiés par rapport aux précédents, par enlèvement ou addition de nucléotide(s) dans une proportion d'environ 15 % par rap-
35 port à la longueur des fragments ci-dessus et/ou modifiés au niveau de la nature des

nucléotides, dès lors que les fragments nucléotidiques modifiés conservent une capacité d'hybridation avec la séquence d'ADN de mycobactéries, analogue à celle que présentent les fragments correspondants non modifiés.

La présente Invention a également pour objet des produits de traduction et/ou des fragments de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont codés par une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique conforme à l'Invention.

La présente Invention a, de plus, pour objet un procédé de détection d'une séquence répétée spécifique du groupe du bacille de la tuberculose, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape dans laquelle on réalise une banque de cosmides recombinants comprenant des fragments d'ADN d'une mycobactérie appropriée supérieurs à 30 kb ; et

(2) une étape dans laquelle on détecte le/les clones cosmidiqes contenant au moins une séquence répétée, par hybridation avec un ADN génomique total de mycobactérie appropriée, marqué de manière convenable.

La révélation des hybrides formés permet la détection rapide des séquences répétées présentes sur le génome desdites mycobactéries.

La présente Invention a également pour objet des réactifs de diagnostic pour la détection d'au moins un groupe de mycobactéries, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins une séquence nucléotidique ou un fragment de celle-ci, telle que définie ci-dessus, pour la détection des mycobactéries du groupe du bacille de la tuberculose, éventuellement associée à au moins une autre séquence nucléotidique appropriée à la détection d'un autre groupe de mycobactéries et/ou au moins un marqueur approprié.

Un tel réactif permet, par exemple, la détection simultanée d'une mycobactérie du groupe du bacille de la tuberculose et d'une mycobactérie du groupe MAIP (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*).

Selon un mode de réalisation avantageux desdits réactifs, ils sont constitués par des paires d'amorces pour la synthèse d'un fragment d'ADN ou d'ARN du groupe du bacille de la tuberculose, chaque amorce comprenant une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, une paire d'amorces conforme à l'Invention est notamment constituée par un oligonucléotide de formule IV apparié à un oligonucléotide de formule V.

Ces amorces permettent notamment la synthèse de la séquence nucléotidique de formule III ci-dessus et/ou de son brin complémentaire et/ou de la séquence IS6110.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits réactifs, ils sont constitués par une sonde de détection d'un fragment d'ADN ou d'ARN du groupe du bacille de la tuberculose.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite sonde de détection comprend avantageusement une séquence nucléotidique de formule III, pour la détection d'une mycobactérie du groupe du bacille de la tuberculose.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux, le marqueur est choisi dans le groupe qui comprend notamment les isotopes radioactifs, les enzymes appropriées, les fluorochromes, les marqueurs chimiques appropriés, les haptènes et les anticorps ou les analogues de base tels que ceux décrits dans le brevet français n° 2 518 755 ou la demande de brevet européen n° 158 758.

15 Lesdits réactifs peuvent être utilisés dans un très grand nombre de techniques de diagnostic basées sur la détection d'acides nucléiques par hybridation ; en particulier, une sonde conforme à l'Invention telle que la séquence de formule III permet notamment de détecter spécifiquement l'ADN d'une mycobactérie du groupe du bacille de la tuberculose et en particulier *Mycobacterium tuberculosis*.

20 La présente Invention a également pour objet une famille de plasmides recombinants, caractérisés en ce qu'ils contiennent au moins une séquence nucléotidique conforme à l'Invention.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit plasmide, il comprend la séquence nucléotidique de formule III ou un fragment de celle-ci.

25 Selon une disposition préférée dudit mode de réalisation, ledit plasmide comprend ladite séquence associée à un vecteur pUC18.

Ce plasmide recombinant a été dénommé pMT01 par les Inventeurs.

30 Conformément à l'Invention, ledit plasmide recombinant a été déposé sous le n° I-900, en date du 25 août 1989, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

La présente Invention a également pour objet un procédé de détection et d'identification rapide d'au moins un groupe et/ou une espèce de mycobactéries dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

35 (1) une étape dans laquelle l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un réactif de diagnostic conforme à l'Invention et

(2) une étape dans laquelle on détecte par tout moyen approprié le ou les produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique de mycobactérie éventuellement présente-réactif de diagnostic.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé, le/les
5 réactifs de diagnostic de l'étape (1) sont une/des paires d'amorces conformes à l'Invention et permettent l'obtention de produits d'amplification de la séquence nucléotidique à détecter.

L'étape d'amplification est notamment l'une des techniques
10 d'amplification génétique telles que la méthode dite Q β répliqueuse (LIZARDI P.M. et al., Biotechnol., 1988, 6) ou la méthode dite P.C.R. (polymerase chain reaction) décrite dans les demandes de brevet européens n° 200 363, n° 201 184 et n° 229 701 déposées par CETUS CO..

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre,
15 les produits d'amplification obtenus en (1) sont détectés par séparation électrophorétique.

Par exemple, si l'on observe la présence d'un fragment d'ADN migrant à l'endroit attendu, on peut conclure que l'échantillon analysé contient de l'ADN du groupe de mycobactéries à détecter.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en
20 oeuvre, les produits d'amplification obtenus en (1) sont détectés par hybridation entre lesdits produits d'amplification et un réactif de diagnostic conforme à l'Invention marqué de manière appropriée.

Un tel procédé a l'avantage de permettre de réaliser un test sensible
25 et spécifique, direct et rapide (moins de 24 heures) de détection d'au moins un groupe de mycobactéries.

Selon un mode de mise en oeuvre particulièrement avantageux de ce
procédé de détection de la présence de *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, il comprend les étapes suivantes :

i) mise en contact de l'échantillon biologique avec un couple de
30 fragments d'acide nucléique, dits amorces, selon l'Invention, l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation et dans ces conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* ;

ii) amplification de l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* ;

iii) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par les amorces, par exemple par électrophorèse sur gel ;

iv) vérification éventuelle de la séquence du fragment amplifié, par exemple par hybridation de sonde spécifique, par séquençage ou par analyse de site de restriction.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de diagnostic *in vitro* d'une infection par des mycobactéries, dans un échantillon biologique déterminé, celui-ci comprend les étapes de :

- a) mise en contact de l'acide nucléique des mycobactéries éventuellement présent, de l'échantillon biologique testé, dans des conditions permettant l'accessibilité sous forme d'ADN simple brin, avec au moins un couple d'amorces nucléotidique selon l'Invention, lesdites amorces pouvant hybrider avec l'acide nucléique de mycobactéries s'il est présent, et initier la synthèse du produit d'élongation desdites amorces, chaque brin de fragment d'ADN de mycobactéries servant de matrice lorsqu'il est apparié avec les amorces ;
- b) séparation des brins d'ADN synthétisés, de leur matrice ;
- c) répétition de la synthèse de produit d'élongation, à partir de chaque brin d'ADN présent à l'issue de l'étape b) et susceptible d'hybrider avec les amorces, jusqu'à l'obtention d'une amplification de l'ADN recherché, suffisante pour être détectée ;
- d) mise en contact du produit de l'étape c) avec une sonde nucléotidique dans des conditions permettant de détecter la présence du fragment d'ADN amplifié recherché ;
- e) détection des produits de l'hybridation éventuellement formés.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé pour le diagnostic *in vitro* ci-dessus défini, la mise en contact de l'échantillon testé est précédée d'une étape de traitement de l'échantillon de façon à en extraire l'acide nucléique.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le procédé comporte une étape préalable à la mise en contact avec les amorces, consistant en un traitement de l'acide nucléique de l'échantillon avec une reverse transcriptase, pour obtenir la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé.

Certains des fragments conformes à l'Invention ont l'avantage tout à fait remarquable de pouvoir être utilisés en tant qu'amorces permettant l'amplification de fragments d'ADN de la séquence de formule III des mycobactéries, notamment du groupe du bacille de la tuberculose.

Ces amorces pour l'amplification de fragments d'ADN de mycobactéries, notamment pour l'amplification de fragments de la séquence précédemment

décrite de *Mycobacterium tuberculosis*, sont caractérisées en ce qu'elles correspondent à des fragments nucléotidiques définis ci-dessus, choisis parmi le groupe suivant ou parmi les fragments nucléotidiques complémentaires des suivants, ou encore des fragments modifiés mais néanmoins fonctionnels s'agissant de leur capacité

- 5 d'hybridation avec ledit fragment d'ADN de mycobactéries en vue de son amplification :
- ISTB-1 : 5' ATGTCAGGTGGTTCATCGAG 3' (IV)
 ISTB-2 : 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3' (V)
 ISTB-3 : 5' TTCGCAATTCTGGCGTTGTCC 3' (VI)
 10 ISTB-4 : 5' TCGACCTACTACGACCACAT 3' (VII)
 ISTB-5 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' (VIII)
 ISTB-6 : 5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3' (IX)
 ISTB-7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3' (X)
 ISTB-8 : 5' TGGCCAGATGCACCGTCGAA 3' (XI)
 15 ISTB-9 : 5' AGTACACATCGATCCGGTTC 3' (XII)
 ISTB-10 : 5' TACTACGCTCAACGCCAGAG 3' (XIII)

De façon tout à fait avantageuse, et dans le cadre de leur application à l'amplification de fragments d'ADN, ces amorces sont prises en combinaison deux à deux, de façon à hybrider dans des conditions déterminées avec les extrémités 5' et 3' respectives du fragment choisi d'ADN à amplifier.

Différentes combinaisons de ces amorces permettent d'amplifier des fragments d'ADN de taille inférieure à 350 paires de bases, en particulier inférieure à 300 paires de bases. Ceci est particulièrement intéressant puisque l'amplification est d'autant meilleure que le fragment amplifié est plus court.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les amorces pour l'amplification de fragments d'ADN répondant aux définitions précédentes, sont encore caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les couples d'amorces suivants :

- ISTB2 et ISTB4 :
 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATG 3' (V) et
 30 5' TCGACCTACTACGACCACAT 3' (VII)
 ISTB2 et ISTB5 :
 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATG 3' (V) et
 5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' (VIII)
 ISTB2 et ISTB7 :
 35 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATG 3' (V) et
 ISTB7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3' (X)

- ISTB5 et ISTB6 :
5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' (VIII) et
ISTB6 : 5' GTTGACGGTTAGCCCACTT 3' (IX)
ISTB6 et ISTB7 :
5 ISTB6 : 5' GTTCAGGGTTAGCCCACTT 3' (IX) et
ISTB7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3' (X)

Une paire d'amorces particulièrement avantageuse pour réaliser l'amplification voulue est la paire d'amorces constituée par ISTB2 et ISTB7, compte tenu de sa spécificité pour les mycobactéries du groupe de la tuberculose.

Comme le montre la figure 1 annexée, les couples d'amorces précisés dirigent l'amplification de fragments ayant respectivement les longueurs suivantes :

- ISTB1 + ISTB3 dirigent l'amplification d'un fragment de
15 260 pb,
ISTB2 + ISTB4 dirigent l'amplification d'un fragment de
198 pb,
ISTB2 + ISTB5 dirigent l'amplification d'un fragment de
248 pb,
20 ISTB5 + ISTB6 dirigent l'amplification d'un fragment de
189 pb,
ISTB6 + ISTB7 dirigent l'amplification d'un fragment de
260 pb,
25 ISTB2 + ISTB7 dirigent l'amplification d'un fragment de
325 pb.

Les tests réalisés pour évaluer l'efficacité d'amplification obtenue à partir des couples (paires) d'amorces précédemment décrits, montrent que cette efficacité est tout à fait satisfaisante pour les cinq derniers couples d'amorces définis, d'autant plus que les amplifications ont été réalisées sur des dilutions contenant 10ng, 30 10pg et 10fg d'ADN purifié de *M. tuberculosis*, ce qui montre que l'amplification peut être réalisée à partir de quantités d'ADN extrêmement faibles.

Un autre avantage des amorces proposées dans la présente Invention, réside dans la spécificité des différents couples proposés.

En particulier, certains couples d'amorces permettent de distinguer entre une infection due à des mycobactéries du groupe de la tuberculose ou une infection due à des bactéries atypiques. Ainsi un test mettant en oeuvre différents couples d'amorces a été réalisé sur l'ADN purifié de 19 espèces mycobactériennes comprenant : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* (ces cinq espèces forment le groupe de la tuberculose), *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. xenopi*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. chelonae* et *M. flavescens*.

Par exemple, le couple ISTB2/ISTB7, et le couple ISTB1/ISTB2, détectent uniquement les mycobactéries du groupe de la tuberculose, et non les mycobactéries atypiques.

Conformément à l'Invention, les amorces définies dans ce qui précède sont avantageusement marquées par un marqueur chimique, physique ou enzymatique et/ou fixées à un support solide, notamment un support particulaire ou membranaire, par exemple des billes magnétiques.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'Invention, le réactif de diagnostic de l'étape (1) est une sonde de détection conforme à l'Invention et permet l'obtention d'hybrides entre la séquence nucléotidique à détecter et ladite sonde.

Les sondes pour la détection de fragments d'ADN amplifiés de mycobactéries, conformes à l'Invention, sont caractérisées en ce qu'il s'agit de fragments nucléotidiques spécifiques de la séquence de formule III dont on cherche à détecter des fragments, choisis parmi les fragments nucléotidiques appartenant au groupe de ceux qui ont été définis plus haut, capables d'hybrider avec ledit fragment d'ADN amplifié, lesdits fragments étant soit marqués à leur extrémité 5' et/ou 3' par une substance que l'on peut détecter, soit fixés à un support physique.

Comme déjà indiqué plus haut, les marqueurs sont avantageusement choisis parmi les isotopes radioactifs, les enzymes ou marqueurs chimiques appropriés, les fluorochromes, les haptènes, les anticorps, des analogues de bases ou encore un marqueur physique.

La fixation à un support peut être faite sur un support solide particulaire ou membranaire, par exemple des billes magnétiques.

De tels fragments nucléotidiques, doivent être capables d'hybrider avec le fragment d'ADN amplifié, et lorsqu'ils sont marqués par une substance que

l'on peut détecter, ils doivent permettre la mise en évidence de la présence d'une infection par les mycobactéries et en particulier celles du groupe de la tuberculose.

Des sondes particulièrement préférées pour la mise en oeuvre de l'Invention sont choisies parmi les fragments nucléotidiques suivants :

5 IS-2 : 5' CATCAGCCGCGTCCACGCCGCGCAACTACGG 3'

IS-4 : 5' TGTGCCGATCGCCCCATCGACCTACTACGA 3'

IS-6 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAG 3'

Les sondes IS-2 et IS-4 ont une taille de 30 bases et elles sont complémentaires des fragments amplifiés à l'aide des paires d'amorces ISTB2/ISTB4, ISTB2/ISTB5, ISTB5/ISTB6, ISTB6/ISTB7 et ISTB2/ISTB7.

La sonde IS-6 est également complémentaire du fragment amplifié à l'aide de la paire d'amorces ISTB2/ISTB4.

Ces sondes permettent avantageusement la détection de tous les membres du groupes des mycobactéries de la tuberculose. Elles présentent également l'avantage pour les quatre dernières paires d'amorces citées, de pouvoir être utilisées simultanément, l'une servant de sonde de capture, et l'autre de sonde de marquage.

Elles permettent donc la réalisation d'une détection directe sur un échantillon biologique en milieu liquide.

Lorsque les sondes sont utilisées comme sondes de marquage, le marqueur peut être choisi parmi le groupe comprenant les isotopes radioactifs, les enzymes appropriées, les fluorochromes ou les marqueurs chimiques ou chimioluminescents appropriés, les haptènes et les anticorps ou les analogues de base tels que ceux décrits dans le Brevet français N° 2 518 755 ou dans la Demande de Brevet européen 158 758, ou encore des marqueurs physiques.

Des marqueurs préférés sont par exemple le phosphore radioactif (^{32}P) incorporé à l'extrémité 5'.

Lorsque les sondes sont utilisées pour la capture, elles sont avantageusement fixées sur un support solide tel que décrit plus haut.

La séquence IS6110 permet également d'identifier l'espèce d'une mycobactérie à l'intérieur du groupe du bacille de la tuberculose, en partant d'une culture pure.

La présente Invention a, en outre, pour objet un kit, coffret ou ensemble coordonné prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé de détection d'au moins un groupe de mycobactéries conforme à l'Invention, caractérisé en ce qu'il

comprend outre des quantités utiles de tampons et de réactifs appropriés pour la mise en oeuvre de ladite détection :

- des doses appropriées d'au moins une paire d'amorces conforme à l'Invention ; et/ou

5 - des doses appropriées d'au moins une sonde ou un fragment de sonde nucléotidique conforme à l'Invention.

Selon un mode de réalisation avantageux du kit ou nécessaire conforme à la présente Invention, celui-ci comporte les éléments suivants :

10 - un couple de fragments d'acide nucléique constitué par deux séquences sélectionnées parmi les séquences ISTB définies plus haut ;

- les réactifs nécessaires pour effectuer une amplification d'ADN ;

15 - éventuellement un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde nucléique ayant une longueur d'au moins 20 bases capable de s'hybrider avec une partie de la séquence IS6110 se situant entre les deux fragments du couple susdit.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du kit pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par des mycobactéries, dans un échantillon biologique déterminé, celui-ci comprend :

20 - au moins une paire d'amorces nucléotidiques correspondant aux définitions données ci-dessus, capable d'hybrider les extrémités 5' et 3' d'un fragment d'ADN spécifique de mycobactéries,

- des réactifs nécessaires à l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon traité,

25 - des réactifs pour effectuer la polymérisation dudit fragment d'ADN, à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification du fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier,

- au moins un fragment nucléotidique pouvant être utilisé comme sonde et capable d'hybrider dans des conditions déterminées avec le fragment d'ADN amplifié,

30 - un contrôle interne de la réaction d'amplification par exemple constitué par un fragment d'ADN éventuellement porté par un plasmide, ledit fragment pouvant aisément être détecté par hybridation, par exemple en ce qu'il contient un gène de résistance à un antibiotique, ledit fragment étant en outre muni à ses deux extrémités d'au moins une amorce d'amplification, ces amorces étant de préférence choisies parmi les amorces de l'Invention,

- une sonde capable d'hybrider avec le fragment d'ADN contenu dans le contrôle interne,
- le cas échéant, une reverse transcriptase pour obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé,
- 5 - le cas échéant, des moyens pour révéler l'hybridation.

A titre d'échantillon biologique, on peut utiliser tout échantillon de fluide biologique ou de tissu biologique comme par exemple le sang, le sérum, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural, l'urine, les crachats, les échantillons obtenus par tubage, aspiration bronchique, ponction ou biopsie du foie, biopsie
10 ganglionnaire, etc.

Le kit de diagnostic selon l'Invention a pour avantage de pouvoir être utilisé directement sur des échantillons cliniques et permet d'obtenir des résultats en un temps très rapide.

La présence d'un contrôle interne ajouté à l'échantillon permet de
15 détecter la présence de "faux négatifs" parmi les échantillons. En effet, lorsque la sonde spécifique du contrôle interne ne détecte pas un produit d'amplification, on est vraisemblablement en présence d'un échantillon contenant un inhibiteur de l'ADN-polymérase, inhibiteur qui gêne l'amplification d'ADN ou d'ADNc de mycobactéries. Dans ce cas, différentes dilutions de l'échantillon testé peuvent permettre de mettre en
20 évidence la présence d'acide nucléique de mycobactéries.

Lorsque le témoin interne présente une réaction positive, une réaction négative au niveau de l'échantillon testé permet de déduire qu'il y a bien absence de mycobactéries.

On note que les amorces incorporées au contrôle interne, ne sont pas
25 nécessairement celles de l'Invention. Cependant, le choix d'autres amorces peut entraîner une diminution de sensibilité.

Selon un mode de réalisation préféré du kit de diagnostic de l'Invention, les amorces utilisées sont ISTB2 et ISTB7 et la sonde de détection du produit éventuel d'amplification est IS-2 éventuellement combinée avec IS-6.

30 On peut aussi avantageusement utiliser plusieurs sondes de détection et, notamment, ajouter IS-6 à IS-2.

L'Invention vise aussi la production des fragments de nucléotides selon l'Invention, qu'ils soient issus de la séquence IS6110 telle que purifiée à partir des mycobactéries de la tuberculose, ou qu'ils soient synthétisés par voie chimique.

A titre d'exemple, on peut citer pour la synthèse de tels fragments d'acides nucléiques, la méthode au phosphotriester, telle que décrite par NARANG, S.A. et al. dans Meth. of Enzymol., (1979), 68, 90. Une autre méthode adaptée pour la préparation de fragments de nucléotides est la méthode au phosphodiester telle que
5 décrite par BROWN, E.L. et al. dans Meth. Enzymol., (1979), 68, 109.

Cette préparation peut également être effectuée par un processus automatisé, par exemple faisant intervenir les diethylphosphoramidites en tant que constituants de départ, et dans ce cas, la synthèse peut être réalisée suivant la description de BEAUCAGE et al., Tetrahedron Letters, (1981), 22, 1859-1862.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente Invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention, dont ils ne constituent en
15 aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Dépistage des mycobactéries du groupe du bacille de la tuberculose.

a) Construction de la banque génomique *M. tuberculosis* :

L'ADN génomique de *M. tuberculosis* H37rv est digéré partiellement par l'endonucléase de restriction SalI en faisant agir 0,03U d'enzyme par µg
20 d'ADN dans un tampon 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol pendant 1 heure à 37°C. L'ADN génomique ainsi digéré est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 %, les fragments entre 30 et 40 kb électrocutés et précipités en éthanol après extraction au phénol/chloroforme (1/1).

25 Le vecteur est le cosmide pH79. Il est digéré de la même manière et déphosphorylé pour éviter toute autoligation.

La ligation s'effectue en mélangeant 700 ng de vecteur et 1,5 µg de fragments d'ADN 30/40 kb (soit un rapport molaire vecteur/insert de 1/2) et la réaction est laissée à 14°C pendant 18 h après avoir ajouté 2,5U de T4 DNA ligase dans un
30 tampon 0,066 M Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 5 mM dithiothréitol, 1 mM ATP.

Les cosmides recombinants sont encapsidés *in vitro* et utilisés pour transformer les bactéries HB101. Les bactéries transformées sont incubées 1 h à 37°C en milieu LB puis étalées sur milieu sélectif Agar contenant 25 µg/ml d'ampicilline. Les colonies résistantes à l'ampicilline sont toutes testées pour leur sensibilité à la tétracycline ; en effet le fragment d'ADN de 30/40 kb est inséré dans le vecteur de ma-
35

nière à inactiver le gène de résistance à la tétracycline (Tet) et à conserver le gène de résistance à l'ampicilline (Amp).

b) Criblage de la banque et détermination de la séquence :

Il est effectué une mini préparation d'ADN des 150 premières colonies transformantes résistantes à l'ampicilline (Amp^r) et sensibles à la tétracycline (tet^s) selon la technique de lyse alcaline. L'ADN de ces préparations est ensuite digéré par l'endonucléase de restriction Sall, analysé en électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % puis transféré sur filtre de nylon. L'ADN est fixé de façon irréversible par 5 mn d'exposition aux UV à 254 nm.

10 Ces différents filtres sont hybridés 16 à 18 heures à 68°C dans un mélange contenant un tampon 6X SSC (1X SSC correspond à 0,15M NaCl et 0,015M citrate de Na), 10 % dextran sulfate, 5X Denhardt's (une solution 1X Denhardt's correspondant à 0,02 % de Ficoll, 0,02 % de polyvinylpyrrolidone et 0,02 % de sérum albumine bovine), 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon ; à ce mélange, on ajoute soit l'ADN génomique total de *M. tuberculosis* H37rv, soit l'ADN génomique total de *M. bovis*-BCG radiomarqué au phosphore 32 par multiamorçage.

Après hybridation, les filtres sont lavés deux fois 10 mn avec du tampon 2X SSC à 65°C, une fois 30 mn avec du tampon 2X SSC+0,1 % SDS à 65°C et enfin une fois 10 mn avec du tampon 0,1X SSC à 65°C. Les filtres encore humides sont mis en autoradiographie à -80°C avec écran intensifiant de 1 h à 2 jours.

Les résultats de ces hybridations ont permis d'isoler un clone cosmique contenant un fragment d'environ 1 kb s'hybridant très fortement avec l'ADN marqué de *M. tuberculosis* H37rv et faiblement avec l'ADN marqué de *M. bovis*-BCG (figure 1).

La figure 2 représente une autoradiographie, après Southern Blot, du clone cosmique, en utilisant les ADN marqués au ³²P : la colonne A correspond à *M. bovis*-BCG ; la colonne B correspond à *M. tuberculosis* ; la flèche montre le fragment spécifique *M. tuberculosis*.

30 Ce fragment a été cloné dans un vecteur pUC18 et préparé en grande quantité. Ce plasmide est dénommé pMT01.

Ce fragment a été digéré par les enzymes HindIII, KpnI, SmaI et par une double digestion SmaI/HindIII puis cloné dans des phages M13mp18 et M13mp19 et séquencé selon la méthode de Sanger en utilisant la Taq polymérase en présence de d-azaGTP à la place du dGTP.

La séquence entière du fragment est représentée par la formule III ci-dessus.

La comparaison des 1152 premières bases de la séquence ainsi déterminée avec l'ensemble de la banque de données de Los Alamos a fait ressortir des homologies de plus de 50 % avec la séquence d'insertion IS3411 (ISHIGURO et col J. Bacteriol 170, 198, 1902-1906). L'homologie a été détectée entre les nucléotides 330 et 1151.

Deux oligonucléotides de 20 mers à l'intérieur de cette séquence homologue ont été synthétisés :

10 ISTB1 : ATGTCAGGTGGTTCATCGAG (formule I ci-dessus)

ISTB2 : ACAGGCCGAGTTTGGTCATC (formule II ci-dessus)

c) Marquage du plasmide pMT01 par 2-acétyl-amino-fluorène (AAF) :

25 µg de plasmide pMT01 ont été marqués selon une procédure adaptée de celle de TCHEN et col (PNAS 81 : 1984 ; 3466-3470). Le taux de substitution obtenu a été de 9,7 %.

d) Préparation d'ADN de mycobactéries

1 ml de culture a été centrifugé 5 mn à 15000 τ /mn, le culot resuspendu dans 200 µl d'eau stérile et soumis à un traitement aux ultra-sons dans un bain sonicant pendant 10 mn. La préparation obtenue a été extraite deux fois par un mélange phénol/chloroforme puis précipitée à l'éthanol. Les culots d'ADN obtenus ont été resuspendus dans 50 µl d'eau stérile.

e) Amplification de l'ADN :

L'amplification est réalisée par la technique d'amplification *in vitro* selon SAIKI et al (Science, 1988, 239, 487-491) en utilisant 12,5 pmoles des oligonucléotides ISTB1 et ISTB2 et 50 ng d'ADN de différentes souches de mycobactéries, notamment les oligonucléotides TB1 et TB2 tels que décrits dans la Demande de Brevet 89 05057, avec 2 U de Taq polymérase dans un tampon 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 125 µM de désoxyribonucléotides et 100 µg/ml de gélatine, le volume final de la réaction étant de 100 µl. Les paramètres des étapes de PCR ont été choisis de la façon suivante : 2 mn à 94°C, 2 mn à 60°C, 2mn à 72°C. 40 cycles sont réalisés en utilisant par exemple l'appareil décrit dans le Brevet français n° 88 08536 déposé par l'Institut Pasteur. Après le dernier cycle, les échantillons sont maintenus à 72°C 10 mn puis stockés à 4°C.

f) Analyse des échantillons :**1. En gel d'agarose**

10 µl des échantillons amplifiés sont déposés sur un gel d'agarose à 2 % dans un tampon TBE et contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV. La figure 3 montre les différents profils obtenus selon les ADN de mycobactéries. Un fragment d'ADN correspondant à la taille attendue est observé avec les ADN des mycobactéries suivantes : *M. tuberculosis* (13), *M. bovis*-BCG (16). Par contre ce fragment n'est pas visible lorsque l'ADN analysé est extrait des souches suivantes : *Mycobacterium asiaticum* (1), *M. avium* (2), *M. chelonae* (3), *M. flavescens* (4), *M. gordonae* (5), *M. kansasii* (6), *M. malmoense* (7), *M. marinum* (8), *M. scrofulaceum* (9), *M. simiae* (10), *M. szulgai* (11), *M. terrae* (12), *M. xenopi* (14), *Nocardia* (15), *Streptomyces antibioticus* (17), *S. lividans* (18), *S. viridochromogene* (19), *S. hydroscopicus* (20), *S. fradiae* (21), *Micromonospora* (22), *Escherichia coli* (23).

15 Ce fragment peut éventuellement être détecté par hybridation avec une sonde correspondant à tout ou partie de IS6110. L'ADN est alors transféré sur une membrane et l'on procède comme décrit en b) ci-dessus

2. En dot blot

20 10 µl des échantillons amplifiés sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 2 mn dans 0,2 ml NaOH 0,4 M contenant 25 mM EDTA puis refroidis rapidement sur glace avant d'être déposés dans les puits d'un appareil à filtrer, ajusté avec une membrane de nitrocellulose.

Après lavage des puits avec 100 µl de SSPE, la membrane est chauffée à 80°C pendant 1 heure. Le filtre est hybridé 16 à 18 heures à 68°C avec le plasmide pMT01 marqué à l'AAF. Après lavages la révélation immunoenzymatique s'effectue selon la technique décrite par MASSE et col (Annales de l'Institut Pasteur/Immunology 136D, 231-243). Seules les espèces appartenant au groupe du bacille de la tuberculose donnent un signal sur la membrane.

EXEMPLE 2 : Identification des différentes espèces à l'intérieur du groupe du bacille de la tuberculose.

30 Après culture selon des techniques appropriées, les ADN sont extraits comme décrit au paragraphe 1d. Une digestion totale est effectuée par l'enzyme PstI. Ces ADN subissent ensuite une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % en TAE avant d'être transférés sur membrane de nitrocellulose selon la technique de Southern. Une hybridation réalisée dans les conditions décrites ci-dessus et

utilisant le plasmide pMT01, ou un plasmide dérivé de celui-ci, marqué par l'acétyl-amino-fluorène, permet après immunodétection des hybrides formés d'identifier l'espèce de la mycobactérie comme le montre la figure 4 où l'on distingue 14 fragments pour une souche de *M. tuberculosis* (sillon 1) et seulement 2 fragments pour *M. bovis*-BCG (sillon 2), alors que l'on ne distingue aucun fragment au niveau du sillon 3 (*M. avium*).

La figure 1 représente la situation des différentes amorces et sondes de formules IV à XVI dans la séquence IS6110, tandis que leurs positions par rapport à la séquence complète de formule III sont représentées à la figure 8.

La figure 5a représente la spécificité d'amplification du couple ISTB2/ISTB7 : l'ARN purifié de 19 espèces mycobactériennes a été amplifié à l'aide de deux couples d'amorces :

- le couple STB1/STB2 permettant l'amplification d'un fragment (383 pb) du gène codant pour la protéine de 65 kD des mycobactéries,
- le couple ISTB2/ISTB7,

les mycobactéries du groupe de la tuberculose présentent une amplification positive avec les deux couples alors que les mycobactéries atypiques ne sont détectées que par le couple TB1/TB2.

La figure 5b représente l'hybridation de la sonde IS-2 sur le fragment amplifié à partir de ISTB2/ISTB7.

La figure 6 représente la sensibilité de la détection par amplification à l'aide du couple ISTB2/ISTB7 et l'hybridation avec la sonde IS-2.

On peut détecter jusqu'à 10 fg d'ADN de *M. tuberculosis*, ce qui correspond à environ trois bactéries.

25 **EXEMPLE 3**

Test de détection de *M. tuberculosis* dans des échantillons cliniques.

Des échantillons cliniques d'origines variées ont été traités suivant les conditions décrites par A. BRISSON-NOEL et al., (THE LANCET, (1989, ii:1069-1071). Une fraction de la préparation d'ADN obtenue a été amplifiée à l'aide des amorces ISTB1/ISTB2 spécifiques de l'antigène 65 kD et des amorces ISTB5/ISTB6 spécifiques de la séquence IS6110. La détection a été réalisée par hybridation avec la sonde IS-4. Les résultats obtenus concordent avec les données cliniques et microbiologiques, ainsi qu'avec les résultats obtenus après hybridation avec une sonde spécifique du gène 65 kD de *M. tuberculosis*.

Conditions expérimentales

a) Amplifications

Les réactions d'amplifications sont réalisées d'après la méthode de Saiki et al. (SCIENCE, (1988, 239, 787-491) en utilisant le mélange réactionnel
5 suivant :

- 50 mM KCl,
- 10 mM Tris-HCl pH 8.3,
- 1,5 mM MgCl₂,
- 125 μM désoxyribonucléotides,
- 10 - 12,5 pmoles oligonucléotides amorces,
- 50 ng ADN,

dans un volume final de 100 μl.

Les cycles de températures utilisées sont les suivants :

- 2 mn à 95 °C,
- 15 - 2 mn à 60 °C, et
- 2 mn à 72 °C,

pendant 40 cycles, suivis de 5 mn à 72 °C.

b) Marquage des sondes

Les sondes ont été marquées par incorporation d'un phosphore
20 radioactif (³²P) à leur extrémité 5' à l'aide de la polynucléotide kinase : 25 pmoles
d'oligonucléotide sonde ont été incubées en présence de Tris-HCl pH 7,5 (50 mM),
MgCl₂ (10mM) ; dithiothritol (5mM) ; 2,5 ml de (γ³²P)-ATP (activité spécifique >
3000 Ci/mmmole) et 2 unités de polynucléotide kinase.

c) Hybridation

25 Les échantillons amplifiés ont été déposés sur un gel d'agarose et
transférés sur une membrane de nylon suivant les techniques classiques (Maniatis).
Les hybridations ont été réalisées à l'aide du tampon d'Hybridation rapide Amersham
comme suit : préhybridation 15 mn à 65 °C, hybridation 2 heures à 65 °C en présence
de 10⁶ cpm de sonde, lavages 2 fois 10 mn en 2 SSC/0,1 % SDS à 20 °C et 1 fois
30 15 mn en 1 SSC/0,1 % SDS à 65 °C.

d) Préparation d'ADN de mycobactéries

1 ml de culture a été centrifugé 5 mn à 15000 tr/mn, le culot resus-
pendu dans 200 μl d'eau stérile et soumis à un traitement aux ultra-sons dans un bain
sonicant pendant 10 mn. La préparation obtenue a été extraite deux fois par un

mélange phénol/chloroforme puis précipitée à l'éthanol. Les culots d'ADN obtenus ont été resuspendus dans 50 µl d'eau stérile.

e) Traitement des échantillons

Les échantillons ne sont pas décontaminés avant le traitement. Un
5 aliquot de 200 µl est placé dans un tube Eppendorf, centrifugé et le culot est resuspendu dans 200 µl de solution de lyse (NaOH 0,1 N, NaCl 2 M, SDS 0,5 %). Après 15 mn d'incubation à 95 °C, on procède à deux extractions phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Le culot d'ADN est resuspendu dans 50 µl d'eau stérile. Le volume utilisé pour l'amplification est de 5 µl.

10 Ce procédé de diagnostic peut être appliqué à des quantités d'ADN faibles, et il s'avère donc intéressant pour la réalisation de diagnostics précoces et rapides.

f) évaluation sur échantillons cliniques (tableau I)

41 échantillons cliniques ont été analysés à l'aide des amorces
15 ISTB2/ISTB7 et de la sonde IS-2. Les mêmes échantillons ont été testés en parallèle par les techniques classiques (examen direct et culture) :

- 16 échantillons positifs en culture ont été trouvés positifs par amplification,
- 18 échantillons négatifs en culture ont été trouvés négatifs par amplification,
- 1 échantillon faiblement positif en culture a été trouvé négatif par amplification ; les
20 Inventeurs ont montré, à l'aide d'un contrôle interne d'amplification (amplification simultanée d'un plasmide ajouté au mélange d'amplification), que cet échantillon contient des inhibiteurs de la réaction d'amplification. Contrairement aux résultats obtenus avec d'autres échantillons qui contenaient également des inhibiteurs, des dilutions successives de cet échantillon sont demeurées négatives,
- 25 - 6 échantillons négatifs en culture ont été trouvés positifs par amplification. Ces résultats ne correspondent pas à des faux positifs car les échantillons provenaient de patients ayant effectivement une tuberculose, le diagnostic ayant été fait sur l'existence d'autres prélèvements positifs en culture ou sur des analyses histobiologiques. Ces résultats montrent la bonne sensibilité du test décrit dans la présente
30 demande, par rapport aux techniques classiques.

TABLEAU I

Comparaison des résultats d'amplification d'ADN avec les
données des procédures standard

5	Résultats	Résultats des procédures		
	PCR	standard		
10		Examen direct	Examen direct	Examen direct
		positif	négatif	négatif
		Culture	Culture	Culture
		positive	positive	négative
	<u>Positif pour</u>			
	<u>M. tuberculosis</u>			
	Sérum	1	0	0
	Expectoration	2	0	0
15	Tubage	10	1	0
	Liquide céphalo- rachidien	0	2	0
	Cystotomie	0	0	3
	Liquide pleural	0	0	2
20	Biopsie du foie	0	0	1
	<u>Négatif pour</u>			
	<u>M. tuberculosis</u>			
	Tubage	0	1	15
	Liquide céphalo- rachidien	0	0	2
25	Biopsie ganglionnaire	0	0	1

Examen direct : Examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelssen ;

Culture : culture sur milieu solide de Loewenstein-Jensen.


30 La figure 7 représente la détection de *M. tuberculosis* dans les échantillons cliniques :

1. tubage (positif en culture),
2. aspiration bronchique (positif à l'examen microscopique et en culture),
- 35 3. tubage (positif à l'examen microscopique et en culture),

4. tubage (négatif en culture),
5. liquide céphalorachidien (positif en culture),
6. tubage (positif en culture).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'Invention ne se limite
5 nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui
viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du
cadre, ni de la portée, de la présente Invention.

28
No de la demande internationale : PCT/

MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 10 , lignes 28-30 de la description 1	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire 3 <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt 4	
COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES DE L'INSTITUT PASTEUR	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) 4	
28, Rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, FRANCE	
Date du dépôt 5 25 AOUT 1989	N° d'ordre 6 I-900
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES 7 (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES 8 (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
<ul style="list-style-type: none"> - Brevet Européen - CANADA - JAPON - ETATS-UNIS D'AMERIQUE 	
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT 9 (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international 9 (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)	
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
A. PAGNIER (Fonctionnaire autorisé) <div style="float: right; text-align: right;">  6 SEP. 1990 </div>	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international 10	
(Fonctionnaire autorisé)	

REVENDEICATIONS

1. Séquence nucléotidique issue mycobactéries, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence nucléotidique répétée dans le génome d'une mycobactérie et spécifique du groupe du bacille de la tuberculose et en ce qu'elle s'hybride très fortement avec *M. tuberculosis*.

2. Séquence selon la Revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte à son extrémité 5' la séquence 5'TGAACCGCCCCGG 3' de formule I et à son extrémité 3' la séquence 5' CCGGGGCGGTTCA 3' de formule II, ladite séquence contenant en outre au moins un fragment d'une séquence de formule III suivante :

	10	20	30	40	50	60
	GTCGACACGC	CTTCTGCACG	GGAAGTCCTT	CTGCGGCCAT	CGTTGCTATG	GCCGCTTACT
	70	80	90	100	110	120
	GCCTTCTAGT	CCGTGCGGCT	CTCGCAACAG	CTCACGGGAC	CTTTTTGAGG	ATCGCCACTT
5	130	140	150	160	170	180
	CAGGTCTTCA	ACTCGCGGAT	GCCCTCATTG	GCAACGTTTG	CGCCCTGCCT	TGGGGCGGCC
	190	200	210	220	230	240
	GGCAGCCACC	AAGTCGAGCA	CTTTGCGGCG	GAACTACTCG	GGGTAACACT	TCGGCACGGA
	250	260	270	280	290	300
	CACGGCTCGT	TCGACGGACG	TCGTGACCAG	AAGTCGAGCA	AACCGACTCC	ACTCTAGCTA
10	310	320	330	340	350	360
	GTGATAACAAG	CTTTTTTGTA	GCCGCGCGAT	GAACCGCCCC	GGCATGTCCG	GAGACTCCAG
	370	380	390	400	410	420
	TTCTTGAAA	GGATGGGGTC	ATGTCAGGTG	GTTCATCGAG	GAGGTACCCG	CCGGAGCTGC
	430	440	450	460	470	480
	GTGAGCGGGC	GGTGC GGATG	GTCCGAGAGA	TCCGCGGTCA	GCACGATTCG	GAGTGGGCAG
15	490	500	510	520	530	540
	CGATCAGTGA	GGTCGCCCCGT	CTACTTGGTG	TTGGCTGCGC	GGAGACGGTG	CGTAAGTGGG
	550	560	570	580	590	600
	TGCGCCAGGC	GCAGGTCGAT	GCCGGCGCAC	GGCCCCGGAC	CACGACCGAA	GAATCCGCTG
20	610	620	630	640	650	660
	AGCTGAAGCG	CTTAGCGGCG	GGACAACGCC	GAATTGCGAA	GGCGGAACGC	GATTTTAAAG
	670	680	690	700	710	720
	ACCGCGTCGG	CTTCTTTCGC	GGCCGAGCTC	GACCGGCCAG	CACGCTAATT	AACGGTTCAT
	730	740	750	760	770	780
25	CGCCGATCAT	CAGGGCCACC	GCGAGGGCCC	CGATGGTTTG	CGGTGGGGTG	TCGAGTCGAT
30						
35						

30

	790	800	810	820	830	840
	CTGCACACAG	CTGACCGAGC	TGGGTGTGCC	GATCGCCCCA	TCGACCTACT	ACGACCACAT
	850	860	870	880	890	900
	EAACCGGGAG	CCCAGCCGCC	GCGAGCTGCG	CGATGGCGAA	CTCAAGGAGC	ACATCAGCCG
5	910	920	930	940	950	960
	CGTCCACGCC	GCCAACTACG	GTGTTTACGG	TGCCCGCAAA	GTGTGGCTAA	CCCTGAACCG
	970	980	990	1000	1010	1020
	TGAGGGCATC	GAGGTGGCCA	GATGCACCGT	CGAACGGCTG	ATGACCAAAC	TCGGCCTGTC
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	CGGGACCACC	CGCGGCAAAG	CCCCCAGGAC	CACGATCGCT	GATCCGGCCA	CAGCCCGTCC
10	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CGCCGATCTC	GTCCAGCGCC	GCTTCGGACC	ACCAGCACCT	AACCGGCTGT	GGGTAGCAGA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	CCTCACCTAT	GTGTCGACCT	GGGCAGGGTT	CGCCTACGTG	GCCTTTGTCA	CCGACGCCTA
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	CGCTCGCAGG	ATCCTGGGCT	GGCGGGTCGC	TTCCACGATG	GCCACCTCCA	TGGTCTCTCGA
15	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	CGCGATCGAG	CAAGCCATCT	GGACCCGCCA	ACAAGAAGGC	GTACTCGACC	TGAAAGACGT
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	TATCCACCAT	ACGGATAGGG	GATCTCAGTA	CACATCGATC	CGGTTCAGCG	AGCGGCTCGC
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	CGAGGCAGGC	ATCCAACCGT	CGGTCCGAGC	GGTCCGAAGC	TCCTATGACA	ATGCACTAGC
20	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	CGAGACGATC	AACGGCCTAT	ACAAGACCGA	GCTGATCAA	CCCAGCAAGC	CCTGGCGGTC
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	CATCGAGGAT	GTCGAGTTGG	CCACCGCGCG	CTGGGTCGAC	TGGTTCAACC	ATCGCCGCCT
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
25	CTACCAGTAC	TGCGGCGACG	TCCCGCCGGT	CGAACTCGAG	GCTGCCTACT	ACGCTCAACG
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	CCAGAGACCA	GCCGCGGCT	GAGGTCTCAG	ATCAGAGAGT	CTCCGGACTC	ACCGGGGCGG

TTC

30

Formule III

3. Séquence nucléotidique selon la Revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend le fragment 343-1152 de la séquence de formule III selon la Revendication 2 et toute séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec celle-ci.

4. Séquence nucléotidique selon la Revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend le fragment 327-1684 de la séquence de formule III selon la Revendication 2 et toute séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec celle-ci.

5 5. Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.

6. Oligonucléotide selon la Revendication 5, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule IV suivante :

ATGTCAGGTGGTTCATCGAG (IV).

10 7. Oligonucléotide selon la Revendication 5 caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule V suivante :

ACAGGCCGAGTTTGGTCATC (V).

8. Fragments nucléotidiques selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'ils présentent l'une des séquences suivantes :

15 ISTB-3 : 5' TTCGCAATTCTGGCGTTGTCC 3' (VI)

ISTB-4 : 5' TCGACCTACTACGACCACAT 3' (VII)

ISTB-5 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' (VIII)

ISTB-6 : 5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3' (IX)

ISTB-7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3' (X)

20 ISTB-8 : 5' TGGCCAGATGCACCGTCGAA 3' (XI)

ISTB-9 : 5' AGTACACATCGATCCGGTTC 3' (XII)

ISTB-10 : 5' TACTACGCTCAACGCCAGAG 3' (XIII)

IS-2 : 5' CATCAGCCGCGTCCACGCCGCAACTACGG 3' (XIV)

IS-4 : 5' TGTGCCGATCGCCCCATCGACCTACTACGA 3' (XV)

25 IS-6 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAG 3' (XVI)

9. Fragments nucléotidiques caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments complémentaires des fragments selon la Revendication 8 ou de fragments modifiés par rapport aux précédents, par enlèvement ou addition de nucléotide(s) dans une proportion d'environ 10 à 15 % par rapport à la longueur des fragments ci-dessus et/ou par modification de la nature des nucléotides, dès lors que les fragments nucléotidiques modifiés conservent une capacité d'hybridation avec la séquence d'ADN de mycobactéries, analogue à celle que présentent les fragments correspondants non modifiés.

35 10. Amorces pour l'amplification de fragments d'ADN de mycobactéries, notamment pour l'amplification de fragments d'une séquence de Mycobacte-

rium tuberculosis, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des fragments nucléotidiques selon l'une quelconque des Revendications 6 à 9, choisis parmi les suivants ou parmi leurs fragments nucléotidiques complémentaires, ou encore parmi des fragments modifiés, mais néanmoins fonctionnels, s'agissant de leur capacité d'hybridation

5 avec ledit fragment d'ADN de mycobactérie en vue de son amplification :

ISTB1 : 5' ATGTCAGGTGGTTCATCGAG 3'

ISTB2 : 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3'

ISTB3 : 5' TTCGCAATTCTGGCGTTGTCC 3'

ISTB4 : 5' TCGACCTACTACGACCACAT 3'

10 ISTB5 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3'

ISTB6 : 5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3'

ISTB7 : 5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3'

ISTB8 : 5' TGGCCAGATGCACCGTCGAA 3'

ISTB9 : 5' AGTACACATCGATCCGGTTC 3'

15 ISTB10 : 5' TACTACGCTCAACGCCAGAG 3'

11. Amorces pour l'amplification de fragments d'ADN de mycobactéries, selon la Revendication 10, caractérisées en ce qu'elles sont prises en combinaison deux à deux, de façon à hybrider dans des conditions déterminées avec les extrémités 5' et 3' respectives du fragment choisi d'ADN à amplifier, notamment en ce qu'il

20 s'agit des couples suivants :

ISTB2 et ISTB4 :

5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3' et

5' TCGACCTACTACGACCACAT 3'

ISTB2 et ISTB5 :

25 5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3' et

5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3'

ISTB5 et ISTB6 :

5' GTCGAGTCGATCTGCACACA 3' et

5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3'

30 ISTB6 et ISTB7 :

5' GTTCAGGGTTAGCCACACTT 3' et

5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3'.

12. Amorces pour l'amplification de fragments d'ADN selon la Revendication 10 ou la Revendication 11 caractérisées en ce qu'elles correspondent au

couple d'amorces suivant :

ISTB2 et ISTB7 :

5' ACAGGCCGAGTTTGGTCATC 3' et

5' CAGCACGCTAATTAACCCGG 3'.

5 13. Amorces selon l'une quelconque des Revendications 10 à 12, caractérisées en ce qu'elles sont marquées par un marqueur chimique, physique ou enzymatique et/ou en ce qu'elles sont fixées à un support solide, notamment un support particulaire ou membranaire, en particulier des billes magnétiques.

10 14. Produits de traduction et/ou fragments de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont codés par une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

15 15. Sonde nucléique apte à détecter par hybridation la présence d'ADN spécifique du Mycobacterium tuberculosis dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence ayant une longueur d'au moins 20 bases capable de s'hybrider avec une partie de la séquence IS 6110 selon la Revendication 4, se situant entre les deux amorces nucléiques.

16. Sonde selon la Revendication 15, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'un des fragments nucléotidiques suivants :

IS-2 : 5' CATCAGCCGCGTCCACGCCGCAACTACGG 3'

20 IS-4 : 5' TGTGCCGATCGCCCATCGACCTACTACGA 3'

IS-6 : 5' GTCGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAG 3'

25 17. Sondes pour la détection de fragments d'ADN amplifiés de mycobactéries, selon l'une quelconque des Revendications 14 et 15, caractérisées en ce qu'il s'agit de fragments nucléotidiques spécifiques d'une séquence de mycobactérie, selon l'une quelconque des Revendications 5 à 8, capables d'hybrider avec ledit fragment d'ADN amplifié, lesdits fragments étant soit marqués à leur extrémité 5' et/ou 3' par une substance que l'on peut détecter, par exemple par un isotope radioactif, une enzyme, un marqueur chimique ou chimioluminescent approprié, un fluorochrome, un haptène, ou un anticorps, des analogues de bases ou encore un
30 marqueur physique, soit fixés à un support solide notamment un support particulaire ou membranaire, par exemple des billes magnétiques.

18. Procédé de détection d'une séquence répétée spécifique du groupe du bacille de la tuberculose, selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4,

caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape dans laquelle on réalise une banque de cosmides recombinants comprenant des fragments d'ADN d'une mycobactérie appropriée supérieurs à 30 kb ; et

5 (2) une étape dans laquelle on détecte le/les clones cosmidiqes contenant au moins une séquence répétée, par hybridation avec un ADN génomique total de mycobactérie appropriée, marqué de manière convenable.

19. Réactif de diagnostic pour la détection d'au moins un groupe de mycobactéries, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique
10 ou un fragment de celle-ci selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8 pour la détection des mycobactéries du groupe du bacille de la tuberculose, éventuellement associée à au moins une autre séquence nucléotidique appropriée à la détection d'un autre groupe de mycobactéries et/ou à au moins un marqueur approprié.

20. Réactif selon la Revendication 19, caractérisé en ce qu'il
15 comprend des paires d'amorces pour la synthèse d'un fragment d'ADN ou d'ARN du groupe du bacille de la tuberculose, chaque amorce comprenant une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8.

21. Réactif selon la Revendication 20, caractérisé en ce qu'il est
20 constitué par une paire d'amorces comprenant des oligonucléotides appariés conformément aux Revendications 10 à 13.

22. Réactif selon la Revendication 19, caractérisé en ce qu'il
comprend une sonde de détection appropriée d'un fragment d'ADN ou d'ARN du groupe du bacille de la tuberculose.

23. Réactif selon la Revendication 14, caractérisé en ce que ladite
25 sonde de détection comprend avantageusement une séquence nucléotidique de formule III, selon l'une quelconque des Revendications 2 à 4.

24. Réactif selon la Revendication 19 ou la Revendication 14,
caractérisé en ce que le marqueur est choisi dans le groupe qui comprend notamment
30 les isotopes radioactifs, les enzymes appropriées, les fluorochromes, les marqueurs chimiques appropriés, les haptènes et les anticorps ou les analogues de base appropriées.

25. Famille de plasmides recombinants, caractérisés en ce qu'ils
contiennent au moins une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.

26. Plasmide selon la Revendication 25, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique de formule III selon la Revendication 2 ou un fragment de celle-ci ou une séquence homologue.

5 27. Plasmide selon la Revendication 25, caractérisé en ce qu'il comprend ladite séquence associée à un vecteur pUC18.

28. Plasmide selon la Revendication 26 ou la Revendication 27, caractérisé en ce qu'il a été dénommé pMT01 et en ce qu'il a été déposé sous le n°I-900, en date du 25 août 1989, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

10 29. Procédé de détection et d'identification rapide d'au moins un groupe et/ou une espèce de mycobactéries dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape dans laquelle l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un réactif de diagnostic selon l'une quelconque des Revendications 20 à 24,

(2) une étape dans laquelle on détecte par tout moyen approprié le ou les produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique de mycobactérie éventuellement présente-réactif de diagnostic.

20 30. Procédé selon la Revendication 29, caractérisé en ce que le/les réactifs de diagnostic de l'étape (1) sont une/des paires d'amorces selon l'une quelconque des revendications 10 à 13 et permettent l'obtention de produits d'amplification de la séquence nucléotidique à détecter.

31. Procédé selon la Revendication 30, caractérisé en ce que les produits d'amplification obtenus en (1) sont détectés par séparation électrophorétique.

25 32. Procédé selon la Revendication 30, caractérisé en ce que les produits d'amplification obtenus en (1) sont détectés par hybridation entre lesdits produits d'amplification et un réactif de diagnostic selon l'une quelconque des Revendications 19, 22, 23 et 24.

30 33. Procédé selon la Revendication 29, caractérisé en ce que le réactif de diagnostic de l'étape (1) est une sonde de détection selon l'une quelconque des Revendications 19, 22, 23 ou 24 et permet l'obtention d'hybrides entre la séquence nucléotidique à détecter et ladite sonde.

34. Procédé de détection de la présence de Mycobacterium tuberculosis dans un échantillon biologique, selon la Revendication 29, caractérisé par les

étapes suivantes :

- i) mise en contact de l'échantillon biologique avec un couple de fragments d'acide nucléiques, dits amorces, selon l'une quelconque des Revendications 10 à 13, l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation et dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN de Mycobacterium tuberculosis ;
- ii) amplification de l'ADN de Mycobacterium tuberculosis ;
- iii) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par les amorces, notamment par électrophorèse sur gel ;
- iv) vérification éventuelle de la séquence du fragment amplifié, notamment par hybridation de sonde spécifique, par séquençage ou par analyse de site de restriction.

35. Procédé pour le diagnostic in vitro d'une infection par des mycobactéries sur un échantillon biologique déterminé, selon la Revendication 29, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mise en contact de l'acide nucléique des mycobactéries éventuellement présent dans l'échantillon biologique testé, si nécessaire dans des conditions permettant l'accessibilité sous forme d'ADN simple brin avec au moins un couple d'amorces nucléotidiques selon l'une quelconque des Revendications 10 à 13, lesdites amorces pouvant hybrider avec l'acide nucléique de mycobactéries s'il est présent, et initier la synthèse du produit d'élongation desdites amorces, chaque brin de fragment d'ADN de mycobactéries servant de matrice lorsqu'il est apparié avec les amorces ;
- b) séparation des brins d'ADN synthétisés, de leur matrice ;
- c) répétition de la synthèse de produit d'élongation, à partir de chaque brin d'ADN présent à l'issue de l'étape b) et susceptible d'hybrider avec les amorces, jusqu'à l'obtention d'une amplification de l'ADN recherché, suffisante pour être détectée,
- d) mise en contact du produit de l'étape c) avec une sonde nucléotidique dans des conditions permettant de détecter la présence du fragment d'ADN amplifié recherché ;
- e) détection des produits de l'hybridation éventuellement formés.

36. Procédé pour le diagnostic in vitro selon la Revendication 34, caractérisé en ce que la mise en contact de l'échantillon testé est précédée d'une étape de traitement de l'échantillon de façon à en extraire l'acide nucléique.

37. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 35 ou 36, caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact avec les amorces, on traite

l'acide nucléique de l'échantillon avec une reverse-transcriptase, pour obtenir la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé.

38. Kit, coffret ou ensemble coordonné prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé de détection d'au moins un groupe et/ou d'une espèce de mycobactéries selon l'une quelconque des Revendications 29 à 37, caractérisé en ce qu'il comprend, outre des quantités utiles de tampons et de réactifs appropriés pour la mise en oeuvre de ladite détection :

- des doses appropriées d'une paire d'amorces selon l'une quelconque des Revendications 10 à 13 ; et/ou

10 - des doses appropriées d'au moins une sonde ou un fragment de sonde nucléotidique selon l'une quelconque des Revendications 18, 21, 22 ou 23.

39. Kit pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par des mycobactéries, sur un échantillon biologique déterminé, selon la Revendication 38, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - au moins un couple d'amorces nucléotidiques selon l'une quelconque des Revendications 10 à 13 capables d'hybrider aux extrémités 5' et 3' d'un fragment d'ADN spécifique de mycobactéries,

- des réactifs nécessaires à l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon traité,

20 - des réactifs pour effectuer la polymérisation dudit fragment d'ADN, à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification du fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier,

- au moins un fragment nucléotidique pouvant être utilisé comme sonde et capable d'hybrider dans des conditions déterminées avec le fragment d'ADN amplifié,

25 - un contrôle interne de la réaction d'amplification, par exemple constitué par un fragment d'ADN éventuellement porté par un plasmide, ledit fragment pouvant être aisément détecté, par exemple en ce qu'il contient un gène de résistance à un antibiotique, ledit fragment étant en outre muni à ses deux extrémités, d'au moins une amorce d'amplification, de préférence choisie parmi les amorces de l'Invention,

30 - une sonde capable d'hybrider avec la fragment d'ADN contenu dans le contrôle interne,

- le cas échéant, une reverse-transcriptase pour obtenir de l'ADNc à partir d'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé,

- le cas échéant des moyens pour révéler l'hybridation.

40. Kit pour le diagnostic in vitro selon la Revendication 39, caractérisé en ce que les amorces nucléotidiques sont ISTB2 et ISTB7 et en ce qu'on utilise au moins une sonde de détection constituée par le fragment nucléotidique IS-2 marqué, éventuellement complétée par la sonde constituée par le fragment nucléotidique IS-6 marqué.

41. Séquence d'acide nucléique, spécifique du Mycobacterium tuberculosis ayant la séquence :

	10	20	30	40	50	60
10	GTCGACACGC	CTTCTGCACG	GGAAGTCCTT	CTGCGGCCAT	CGTTGCTATG	GCCGCTTACT
	70	80	90	100	110	120
	GCCTTCTAGT	CCGTGCGGCT	CTCGCAACAG	CTCACGGGAC	CTTTTTGAGG	ATCGCCACTT
	130	140	150	160	170	180
	CAGGTCTTCA	ACTCGCGGAT	GCCCTCATTG	GCAACGTTTG	CGCCCTGCCT	TGGGGCGGCC
	190	200	210	220	230	240
15	GGCAGCCACC	AAGTCGAGCA	CTTTGCGGCG	GAACTACTCG	GGGTAACACT	TCGGCAGGGA
	250	260	270	280	290	300
	CACGGCTCGT	TCGACGGACG	TCGTGACCAG	AAGTCGAGCA	AACCGACTCC	ACTCTAGCTA
	310	320	330	340	350	360
	GTGATAACAAG	CTTTTTTGTA	GCCGCGCGAT	GAACCGCCCC	GGCATGTCCG	GAGACTCCAG
20	370	380	390	400	410	420
	TTCTTGAAA	GGATGGGGTC	ATGTCAGGTG	GTTCATCGAG	GAGGTACCCG	CCGGAGCTGC
	430	440	450	460	470	480
	GTGAGCGGGC	GGTGGGATG	GTCGAGAGA	TCCGCGGTCA	GCACGATTCC	GAGTGGGCAG
	490	500	510	520	530	540
	CGATCAGTGA	GGTCGCCCCG	CTACTTGGTG	TTGGCTGCGC	GGAGACGGTG	CGTAAGTGGG
25	550	560	570	580	590	600
	TGCGCCAGGC	GCAGGTCGAT	GCCGGCGCAC	GGCCCCGGAC	CACGACCGAA	GAATCCGCTG
	610	620	630	640	650	660
	AGCTGAAGCG	CTTAGCGGCG	GGACAACGCC	GAATTGCGAA	GGCGGAACGC	GATTTTAAAG
	670	680	690	700	710	720
30	ACCGCGTCGG	CTTCTTCGCG	GGCCGAGCTC	GACCGGCCAG	CACGCTAATT	AACGGTTCAT
	730	740	750	760	770	780
	CGCCGATCAT	CAGGGCCACC	GCGAGGGCCC	CGATGGTTTG	CGGTGGGGTG	TCGAGTCGAT

39

5

790	800	810	820	830	840
CTGCACACAG	CTGACCGAGC	TGGGTGTGCC	GATCGCCCCA	TCGACCTACT	ACGACCACAT
850	860	870	880	890	900
EAACCGGGAG	CCCAGCCGCC	GCGAGCTGCG	CGATGGCGAA	CTCAAGGAGC	ACATCAGCCG
910	920	930	940	950	960
CGTCCACGCC	GCCAACTACG	GTGTTTACGG	TGCCCGCAA	GTGTGGCTAA	CCCTGAACCG
970	980	990	1000	1010	1020
TGAGGGCATC	GAGGTGGCCA	GATGCACCGT	CGAACGGCTG	ATGACCAAAC	TCGGCCTGTC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CGGGACCACC	CGCGGCAAAG	CCCCCAGGAC	CACGATCGCT	GATCCGGCCA	CAGCCCGTCC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGCCGATCTC	GTCCAGCGCC	GCTTCGGACC	ACCAGCACCT	AACCGGCTGT	GGGTAGCAGA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCTCACCTAT	GTGTCGACCT	GGGCAGGGTT	CGCCTACGTG	GCCTTTGTCA	CCGACGCCTA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGCTCGCAGG	ATCCTGGGCT	GGCGGGTCCG	TTCCACGATG	GCCACCTCCA	TGGTCCTCGA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGCGATCGAG	CAAGCCATCT	GGACCCGCCA	ACAAGAAGGC	GTA CT CGACC	TGAAAGACGT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TATCCACCAT	ACGGATAGGG	GATCTCAGTA	CACATCGATC	CGGTT CAGCG	AGCGGCTCGC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CGAGGCAGGC	ATCCAACCGT	CGGTCCGAGC	GGTCGGAAGC	TCCTATGACA	ATGCACTAGC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CGAGACGATC	AACGGCCTAT	ACAAGACCGA	GCTGATCAA	CCCGGCAAGC	CCTGGCGGTC
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CATCGAGGAT	GTCGAGTTGG	CCACCGCGCG	CTGGGTCGAC	TGGTTCAACC	ATCGCCGCCT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTACCAGTAC	TGCGGCGACG	TCCCGCCGGT	CGAACTCGAG	GCTGCCTACT	ACGCTCAACG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CCAGAGACCA	GCCGCGGCT	GAGGTCTCAG	ATCAGAGAGT	CTCCGGACTC	ACCGGGGCGG

TTCA

Localisation des amorces et des sondes sur la
séquence IS6110

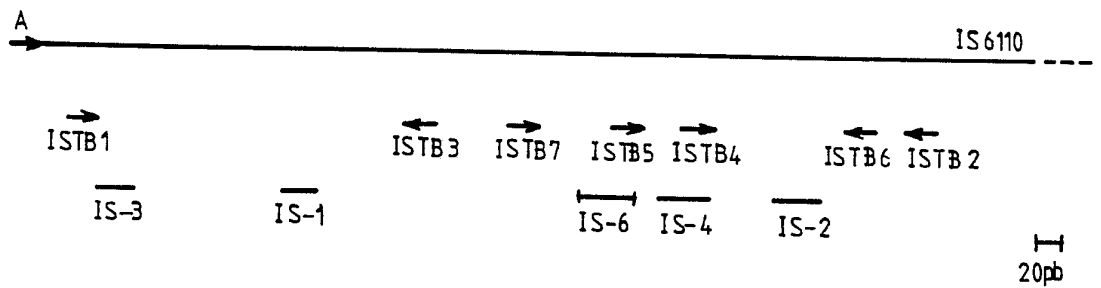


FIG.1



FIG. 2



FIG.3

4 / 10

1 2 3

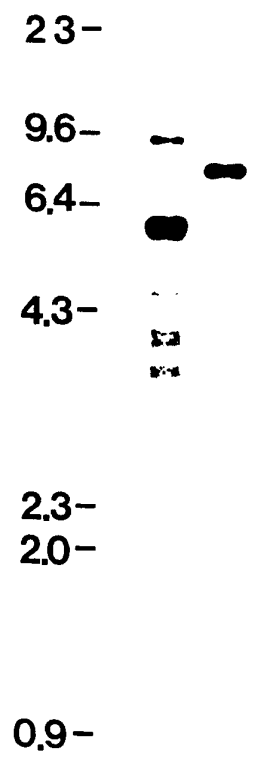


FIG. 4

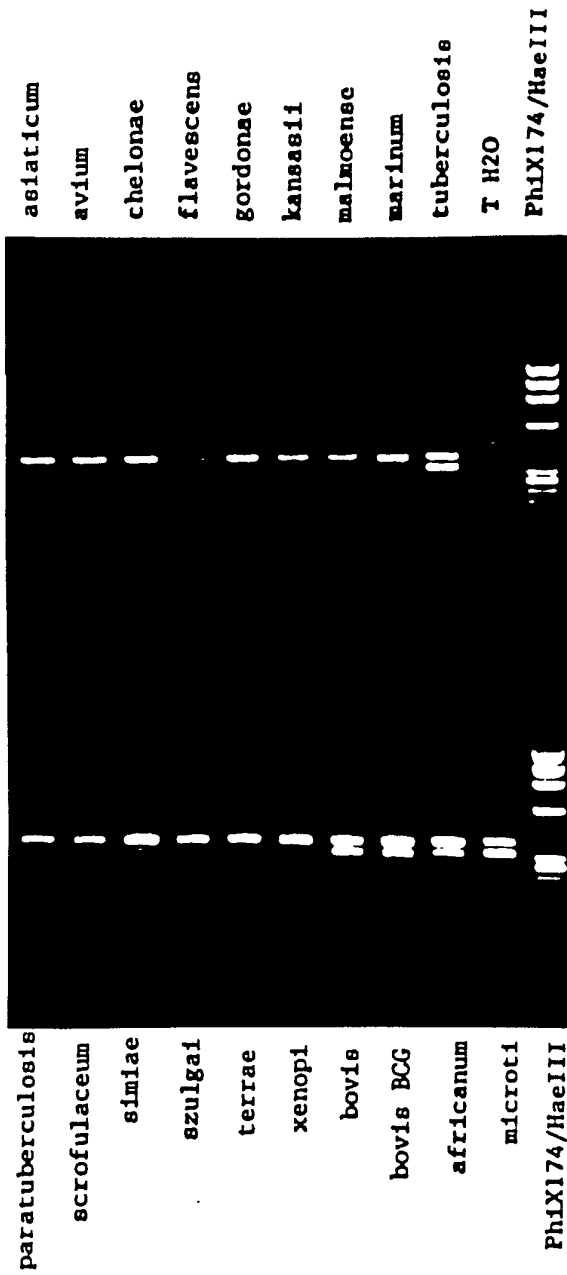


FIG. 5a

6 / 10

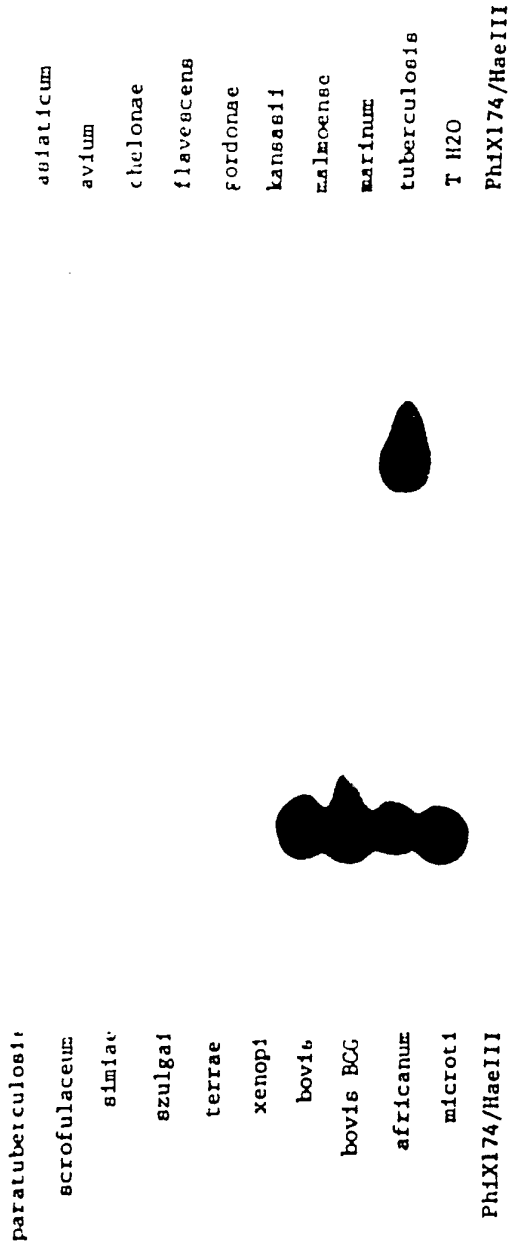


FIG.5b

7/10

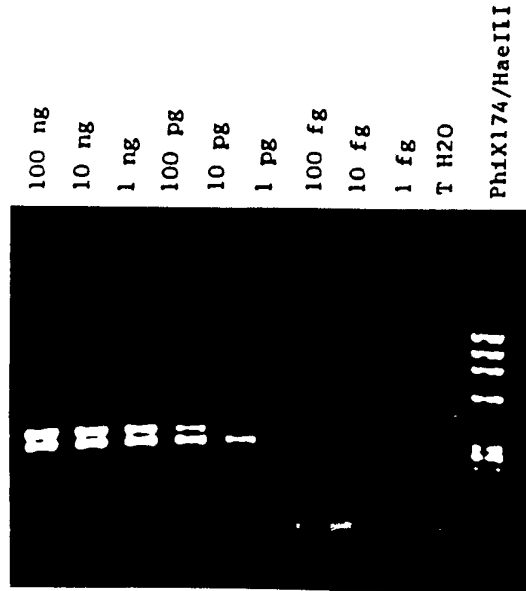


FIG. 6

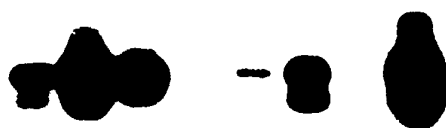
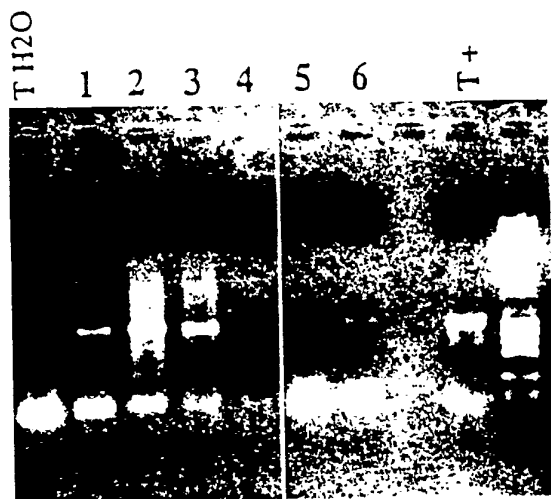


FIG. 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10	20	30	40	50	60
GTGACAGGC	CTTCTGCAG	GGAAGTCTT	CTGGGGCCAT	CGTTGCTATG	GGCGCTTACT
70	80	90	100	110	120
GCCTTCTAGT	CGGTGGGGCT	CTGCAACAG	CTCACGGGAC	CTTTTTGAGG	ATGGCCACTT
130	140	150	160	170	180
CAGGTCTTCA	ACTGGGGAT	GGCTCATTTG	GCAAGTTTGG	CGGCTGGCT	TGGGGGGGGC
190	200	210	220	230	240
GGCAGCCACC	AAGTCGAGCA	CTTTGGGGGG	GAACTACTCG	GGTAACTACT	TGGGCAAGGA
250	260	270	280	290	300
CACGGCTCGT	TGGACGGAG	TGCTGACCAG	AAGTCGAGCA	AACCGACTCC	ACTCTAGCTA
310	320	330	340	350	360
GTGATACAAG	CTTTTTTGTA	GGGGGGGAT	GAAAGGGGGC	GGCATGTCCG	GAGACTCCAG
370	380	390	400	410	420
TTCTTGAAA	GGATGGGGTC	ATGTCAGGTG	GTTTCATGAG	GAGGTACCGG	CGGGAGCTGC
430	440	450	460	470	480
			ISTB-1		IS-3
GTGAGGGGGC	GGTGGGGATG	GTCGAGAGA	TCCGGGTCA	GCAAGATTCC	GAGTGGGCCG
490	500	510	520	530	540
CGATCAGTGA	GGTCGGGGT	CTACTTGGTG	TTGGCTGGGC	GGAGAGGGTG	CGTAAGTGGG
550	560	570	580	590	600
				IS-1	
TGGGOCAGGC	GCAGGTGAT	GGGGGGCAC	GGGGGGGAC	CAGGAGGAA	GAATCCGCTG
610	620	630	640	650	660
AGCTGAAGGG	CTTAGGGGG	GGACAAGCC	GAATTGGGAA	GGGGAAAGC	GATTTTAAAG
670	680	690	700	710	720
			ISTB-3		
AACGGGTGGG	CTTCTCTGGC	GGGGAGCTC	GACGGGGCAG	CAGGCTAATT	AAAGGTTTAT
730	740	750	760	770	780
			ISTB-7		
CGGGATCAT	CAGGGCCACC	GGGAGGGGCC	CGATGGTTTG	CGGTGGGGTG	TGGAGTGGAT
790	800	810	820	830	840
				ISTB-5	
CTGCACACAG	CTGACCGAGC	TGGGTGTGCC	GATCGGGCCA	TGCACTACT	ACGACCAT
850	860	870	880	890	900
IS-6		IS-4	ISTB-4		
CAACGGGGAG	CCGAGGGGC	GGGAGCTGGC	CGATGGGGAA	CTCAAGGAGC	ACATCAGCCG
910	920	930	940	950	960
CGTCCACGGC	GCCAACTACG	GTGTTTACGG	TGGGGGCAA	GTGTGGCTAA	CCCTGAACCG
970	980	990	1000	1010	1020
IS-2			ISTB-6		
TGAGGGCATC	GAGGTGGCCA	GATGCACCGT	CGAACGGCTG	ATGACCAAAC	TGGGCTGTG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
	ISTB-8		ISTB-2		
CGGGACCAAC	CGGGCAAAG	CCGGCAGGAC	CAGGATGGCT	GATCGGGCCA	CAGGGGGTCC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGGGATCTC	GTCCAGGGC	GCTTGGGAAC	AACAGCAACT	AACGGGCTGT	GGGTAGCAGA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCTCACCTAT	GTGTGCAACT	GGGAGGGTT	CGCTACGTG	GCCTTTGTCA	CGAGGGCTA

FIG. 8

10/10

1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGCTCGCAGG	ATCCTGGGCT	GGGGGTGCG	TTCCAAGATG	GCCACTCCA	TGGTCTCGA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGGATCGAG	CAAGCCATCT	GGACCCGCCA	ACAAGAAGGC	GTACTIONACC	TGAAAGACGT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TATCCACCAT	ACGGATAGGG	GATCTCAGTA	CACATOGATC	CGGTTCAAGC	AGCGGCTCGC
1390	1400	1410	ISTB-9	1420	1430
CGAGGCAGGC	ATCCAACCGT	CGGTCCGAGC	GGTCGGAAGC	TCCTATGACA	ATGCACTAGC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CGAGACGATC	AACGGCCTAT	ACAAGACCGA	GCTGATCAA	CCCGGCAAGC	CCTGGCGGTC
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CATCGAGGAT	GTCGAGTTGG	CCACCGCGCG	CTGGGTGAC	TGGTTCAACC	ATCGCGCGCT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
<u>CTACCAGTAC</u>	<u>TGCGGGGAGC</u>	<u>TCOCCCGGT</u>	<u>CGAACTCGAG</u>	<u>GCTGCTACT</u>	<u>ACGCTCAAG</u>
IS-5/ 1630	1640	1650	1660	1670	ISTB-10 1680
<u>CCAGAGACCA</u>	<u>GCCGCGGCT</u>	<u>GAGGTCTCAG</u>	<u>ATCAGAGAGT</u>	<u>CTCCGGACTC</u>	<u>ACCGGGGCG</u>

TTCA

FIG. 8(SUITE)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00591

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁸		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ : C 12 N 15/31, C 07 H 21/04, C 12 Q 1/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵ :	C 12 N, C 12 Q, G 01 N, A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Molecular Microbiology, vol. 3, No: 7, July 1989, A.J. Hance et al.: "Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA", pages 843-849 see the whole article (cited in the application)	1,18-41
P,X	Nucleic Acids Research, vol. 18, No: 1, 1990, Oxford University Press, D. Thierry et al.: "IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuber- culosis complex", page 188 see the whole article	1
P,A		34,41
A	The Lancet, vol. 2, No: 8671, 4 November 1989, A. Brisson-Noël et al.: "Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples", pages 1069-1071 see the whole article	34-41
E	WO, A. 90/10085 (COGENT LTD) 7 September 1990	1
<p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
18 December 1990 (18.12.90)		24 January 1991 (24.01.91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	see abstract; pages 3-5 --	
X	EP, A, 0288306 (McFADDEN) 26 October 1988 see abstract; claims 1,12-19 --	1
A	EP, A, 0272009 (HOGAN) 22 June 1988 --	
X	International Journal of Leprosy, vol. 56, No: 4, 1988, (US), Prabhakara P. Reddi et al.: "Repetitive DNA sequence of Mycobacterium tuberculosis: Analysis of differential hybridization pattern with other mycobacteria", pages 592-598 see the whole article (cited in the application) --	1,18,19, 22,25,29-33
X	Journal of Clinical Microbiology, vol. 26, No: 11, November 1988, American Society for Microbiology, K.D. Eisenach et al.: "Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis", pages 2240- 2245 see the whole article (cited in the application) --	1,18,19,22, 25,29-33
A	Molecular and Cellular Probes, vol. 2, No: 2, 1988, Academic Press Ltd., R.N. Picken et al.: "DNA probes for mycobacteria. I. Isolation of DNA probes for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex and for mycobacteria other than tuberculosis (MOTT)" pages 111-124, see pages 112,113,115,122 --	1,18,19,22, 29-33
A	Tubercle, vol. 69, No: 1, March 1988, Longman Group UK Ltd., Chia C. Pao et al.: "The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned Mycobacterium tuberculosis DNA as probes", pages 27-36 see the whole article -----	18-33

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000591

SA 40072

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 18/01/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9010085	07-09-90	GB-A- 2228485	29-08-90
EP-A- 0288306	26-10-88	AU-A- 1628688	02-12-88
		EP-A- 0356450	07-03-90
		WO-A- 8808456	03-11-88
EP-A- 0272009	22-06-88	AU-A- 1041988	16-06-88
		JP-T- 1503356	16-11-89
		WO-A- 8803957	02-06-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00591

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 N 15/31, C 07 H 21/04, C 12 Q 1/68		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 N, C 12 Q, G 01 N, A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	Molecular Microbiology, volume 3, no. 7, juillet 1989, A.J. Hance et al.: "Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA", pages 843-849 voir l'article en entier (cité dans la demande)	1,18-41
--		
P,X	Nucleic Acids Research, volume 18, no. 1, 1990, Oxford University Press, D. Thierry et al.: "IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex", page 188 voir l'article en entier	1
P,A	--	34,41
A	The Lancet, volume 2, no. 8671, 4 novembre 1989,	34-41 ./.
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
18 décembre 1990	24. 01. 91	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">M. PEIS</div> <div style="font-family: cursive; font-size: 1.2em;">M. Peis</div> </div>	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	A. Brisson-Noël et al.: "Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples", pages 1069-1071 voir l'article en entier --	
E	WO, A, 90/10085 (COGENT LTD) 7 septembre 1990 voir abrégé; pages 3-5 --	1
X	EP, A, 0288306 (McFADDEN) 26 octobre 1988 voir abrégé; revendications 1,12-19 --	1
A	EP, A, 0272009 (HOGAN) 22 juin 1988 --	
X	International Journal of Leprosy, volume 56, no. 4, 1988, (US), Prabhakara P. Reddi et al.: "Repetitive DNA sequence of Mycobacterium tuberculosis: Analysis of differential hybridization pattern with other mycobacteria", pages 592-598 voir l'article en entier (cité dans la demande) --	1,18,19,22, 25,29-33
X	Journal of Clinical Microbiology, volume 26, no. 11, novembre 1988, American Society for Microbiology, K.D. Eisenach et al.: "Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis", pages 2240-2245 voir l'article en entier (cité dans la demande) --	1,18,19,22, 25,29-33
A	Molecular and Cellular Probes, volume 2, no. 2, 1988, Academic Press Ltd., R.N. Picken et al.: "DNA probes for mycobacteria. I. Isolation of DNA probes for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex and for mycobacteria other than tuberculosis (MOTT)", pages 111-124 voir pages 112,113,115,122 --	1,18,19,22, 29-33

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	<p>Tubercle, volume 69, no. 1, mars 1988, Longman Group UK Ltd., Chia C. Pao et al.: "The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned Mycobacterium tuberculosis DNA as probes", pages 27-36 voir l'article en entier</p> <p>-----</p>	18-33

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000591

SA 40072

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 18/01/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 9010085	07-09-90	GB-A- 2228485	29-08-90
EP-A- 0288306	26-10-88	AU-A- 1628688 EP-A- 0356450 WO-A- 8808456	02-12-88 07-03-90 03-11-88
EP-A- 0272009	22-06-88	AU-A- 1041988 JP-T- 1503356 WO-A- 8803957	16-06-88 16-11-89 02-06-88

EPO FORM I/0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82