

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

PERFECTIONNEMENTS A UN PROCEDE D'AMPLIFICATION
ENZYMATIQUE IN VITRO

L'invention a pour objet un perfectionnement apporté à la technique d'amplification enzymatique in vitro, communément désignée sous l'appellation procédé PCR.

5 Les principes à la base de cette technique ont été déjà amplement décrits et sa mise en oeuvre a fait l'objet de dépôts de demandes de brevet. On peut citer à cet effet les publications européennes de brevet EP-A-201 184 et EP-A-200 362.

10 Pour la meilleure compréhension de l'invention, on rappellera ci-après les principaux éléments qui caractérisent le procédé PCR ainsi que les diverses applications auxquelles il peut donner lieu.

La technique PCR permet d'amplifier considérablement une séquence d'ADN spécifique, appelée séquence d'ADN cible, au sein d'un mélange d'ADN hétérogène.

15 Elle est basée sur le principe de la réplication de l'ADN par duplication enzymatique et l'utilisation d'amorces spécifiques encadrant la séquence d'ADN à amplifier, les extrémités 3' de ces amorces étant utilisées comme point de démarrage pour les enzymes de réplication de l'ADN, appelées ADN polymérases.

20 Le schéma de principe de cette technique est rappelé figure 1.

L'amplification de la séquence procède par cycles successifs. Chaque cycle comporte trois étapes : une première étape de dénaturation thermique de l'ADN, qui sépare l'ADN double brin en deux mono-brins, une seconde étape d'hybridation des amorces sur les séquences des mono-brins
25 qui leur sont complémentaires, enfin une dernière étape d'élongation à partir des amorces à l'aide d'une ADN polymérase.

Pour mettre en oeuvre une amplification par PCR, on prépare un milieu réactionnel qui contient l'ADN hétérologue à analyser, les amorces, l'ADN polymérase. Ce milieu peut également contenir d'autres éléments
30 tels qu'un tampon, des sels, des désoxynucléotides tri-phosphates.

Un des intérêts de cette technique est qu'il n'est pas toujours nécessaire de purifier l'ADN à analyser ; la technique peut être mise en oeuvre directement à partir d'un lysat cellulaire par exemple. En pratique, les échantillons d'ADN peuvent être préparés de façon très variée.

De façon non limitative, on peut citer des procédures de purification comportant par exemple des extractions au phénol ou par tout autre solvant, ou encore des passages dans des systèmes d'affinité. Dans le cas où la préparation ne comporte que des étapes de lyse de l'échantillon, la lyse peut être effectuée directement avant l'amplification.

Quelles que soient les procédures utilisées, elles conduisent à des molécules d'ADN dont les longueurs se trouvent aux environs de 0,5 à 20 kb alors que la longueur des séquences choisies comme cibles d'amplification est généralement de l'ordre de quelques centaines de nucléotides, soit environ 0,1 kb à 0,5 Kb. On se limite généralement à cet ordre de grandeur, pour des raisons d'efficacité de la technique. On peut toutefois rechercher dans certains cas l'amplification de segments d'ADN dont la longueur dépasse plusieurs centaines de nucléotides.

Pour préparer les amorces qui vont s'hybrider sur chaque monobrin après l'étape de dénaturation de l'ADN, on peut procéder de différentes façons. Généralement, on connaît quelques séquences d'ADN bordant le fragment d'ADN à amplifier, on procède alors par synthèse des oligonucléotides amorces correspondant à ces séquences. Ces oligonucléotides peuvent, avant utilisation, être modifiés sans pour autant éliminer leur capacité à s'hybrider sur les séquences cibles ni leur capacité à servir de point de démarrage pour l'élongation. Par exemple, on peut ajouter à leurs extrémités 5' un site de restriction enzymatique, ce qui permet par la suite de cloner le fragment d'ADN amplifié après coupure par les enzymes de restriction correspondantes. On peut aussi introduire au niveau des extrémités 5' un promoteur, ce qui permet d'étudier par la suite les produits de transcription.

Le milieu étant ainsi préparé, le cycle réactionnel peut commencer. Les conditions opératoires des différentes étapes se distinguent essentiellement par la température à laquelle elles ont lieu. Les conditions de dénaturation correspondent généralement à une élévation de la température du milieu réactionnel au-dessus de 90°, l'hybridation a lieu généralement entre 50 et 60°C et l'élongation par l'ADN polymérase peut s'effectuer à des températures relativement élevées, de l'ordre de 70°C si

l'on utilise une ADN polymérase stable à la chaleur. Dans ce cas, l'ensemble de cycles opératoires peut avoir lieu sans qu'il soit nécessaire de rajouter des enzymes en cours de cycle.

5 Après un premier cycle, une séquence cible présente en x exemplaires dans l'échantillon à tester se trouvera dupliquée, c'est-à-dire présente à $2x$ exemplaires. Après n cycles d'amplification, le nombre de séquences cibles sera multiplié par 2^n , c'est-à-dire qu'une séquence cible présente initialement en x exemplaires sera présente en $x \cdot 2^n$ exemplaires (voir figure 1). Même si les efficacités expérimentales ne sont pas de 100 %
10 à chaque cycle, cette croissance exponentielle théorique du facteur d'amplification de la séquence cible donne une bonne illustration de la puissance de cette procédure. Les procédures de PCR couramment utilisées font état de 20, 30, voire 40 cycles d'amplification, ce qui correspond à des facteurs de multiplication théoriques de 2^{20} , de 2^{30} ou de 2^{40} de la
15 quantité d'échantillon initial.

La puissance de cette technique en fait un outil extrêmement précieux en recherche fondamentale ou clinique. Elle trouve des applications pratiques immédiates à des fins de pronostic ou diagnostic, par exemple pour détecter la présence de séquences d'ADN d'intérêt médical
20 correspondant à des microorganismes infectieux ou encore à des gènes cellulaires impliqués dans des pathologies diverses.

Toutefois, la puissance même de cette technique la rend extrêmement sensible à des risques de contamination des échantillons à analyser. L'une des conséquences les plus immédiates d'une contamination
25 éventuelle est l'obtention de faux positifs.

Plus précisément, le contaminant majeur d'un échantillon négatif pouvant se répandre aisément dans un laboratoire pratiquant cette technologie, est le produit d'amplification lui-même tel qu'obtenu
30 antérieurement au cours de l'analyse d'un autre échantillon en utilisant les mêmes amorces.

Ainsi, une fraction, aussi minime soit-elle, d'un produit d'amplification obtenu antérieurement, fera l'objet, dans un procédé ultérieur destiné à l'analyse d'une autre séquence cible, présente dans un échantillon initialement négatif pour la séquence cible du procédé

antérieur, d'une amplification considérable et pourra donner lieu à un résultat positif pour la séquence cible antérieure à la place d'un résultat négatif.

5 La définition d'un produit d'amplification au sens de l'invention, sera mieux comprise en liaison avec la figure 1.

On peut voir que les élongations spécifiques effectuées par l'ADN polymérase aboutissent à la génération de produits qui présentent des structures moléculaires différentes. Les élongations effectuées sur les molécules cibles originelles de l'échantillon donnent naissance à des brins
10 d'ADN commençant au niveau d'une amorce et dont la longueur est statistique, s'arrêtant à des distances variées de leur point d'initiation. A partir d'un brin d'ADN ainsi polymérisé, et dont la séquence commence exactement par l'amorce spécifique, un second cycle d'amplification générera une molécule d'ADN complémentaire, commençant au niveau de la
15 seconde amorce et se terminant au plus long, après la duplication de l'amorce située du côté 5' du brin ainsi dupliqué. Ce nouveau brin d'ADN aura une longueur précisément égale à la distance séparant les extrémités 5' des deux amorces sur l'ADN cible. Un tel brin d'ADN, de longueur finie, et comportant à chacune de ses extrémités la séquence directe ou
20 complémentaire des oligonucléotides amorces choisis pour l'amplification sera ultérieurement lui-même amplifié en donnant à chaque cycle un produit identique à lui-même. On peut calculer qu'en partant de x brins d'ADN soumis à n cycles d'amplification, on obtiendra $x \cdot 2^n$ brins, dont $x(n+1)$ auront une longueur variable et $x \cdot 2^n - x(n+1)$ auront la longueur
25 discrète du fragment délimité par les amorces d'amplification.

Le rapport, au bout des n cycles d'amplification entre la quantité de molécules de longueur variable et de longueur discrète sera donc de :

$$\frac{x \cdot 2^n - x(n+1)}{x(n+1)}$$

30 ce qui représente un excès considérable de molécules de longueur finie par rapport aux molécules de longueur variable. Ce sont ces molécules d'ADN de longueur finie constituées de la séquence d'ADN cible à analyser délimitée à chaque extrémité par les deux oligonucléotides amorces, que

l'on appelle produits d'amplification. Elles contiennent en effet tous les éléments nécessaires pour une réamplification ultérieure.

Par contre, les molécules amplifiées de longueur variable ont en commun la caractéristique de commencer, du côté 5', par l'un des oligonucléotides amorces utilisés pour l'amplification.

Des considérations qui précèdent, il résulte que lorsqu'on initie une nouvelle réaction PCR à partir d'un échantillon d'ADN hétérologue, il est indispensable que le milieu soit dépourvu de toute contamination, venant soit des matériels, soit des instruments utilisés, et notamment due à des produits d'amplification issus d'un cycle PCR antérieur utilisant des oligonucléotides amorces identiques.

Idéalement, un milieu réactionnel non contaminé par des produits d'amplification antérieure ne comportera donc la séquence d'ADN cible à amplifier qu'au sein de molécules d'ADN de longueur variable, de l'ordre de 0,5 à 20 kb, comme indiqué précédemment, avec une représentation statistique de la localisation de la séquence cible sur une portion centrale ou distale des molécules d'ADN. La séquence d'ADN à amplifier sera donc comprise dans une molécule plus longue, entourée de part et d'autre de ses extrémités définies comme les régions d'hybridation des amorces, par des séquences d'ADN contiguës de longueur variant approximativement de 0 à 10 kb, si les molécules totales ont une longueur variant de 0,5 à 20 kb. Ainsi, les molécules d'ADN à analyser par amplification ne porteront les séquences cibles en position distale que dans une fraction minoritaire. Au contraire, une contamination par un produit d'amplification antérieure apportera exclusivement un brin d'ADN cible délimité, à ses extrémités, par les séquences correspondant aux oligonucléotides amorces spécifiques et à leurs séquences complémentaires. Ces produits d'amplifications antérieures, de par leur structure, auront d'autant plus tendance à être utilisés comme substrats lors de la réaction ultérieure.

L'invention vise avant tout à résoudre ce problème de contamination par des produits d'amplifications antérieures, d'un milieu réactionnel convenant pour la mise en oeuvre d'un procédé PCR.

Elle vise également à optimiser les conditions d'utilisation de la PCR, en rendant cette technique aussi fiable qu'elle peut être puissante.

La Demanderesse a maintenant établi que le but visé est atteint lorsque, à la fin d'une réaction PCR antérieure, on rend les produits d'amplification obtenus inaptes à une réamplification ultérieure dans une réaction PCR ultérieure qui utilise les mêmes oligonucléotides amorces et/ou avant toute réaction PCR ultérieure faisant suite à une réaction PCR antérieure qui utilise les mêmes oligonucléotides amorces, on met en oeuvre un prétraitement prévenant sélectivement la réamplification des produits d'amplifications antérieures résultant de la réaction PCR antérieure utilisant les mêmes oligonucléotides amorces.

C'est pourquoi, l'invention a pour objet un procédé d'amplification enzymatique in vitro (procédé PCR) d'une séquence d'ADN cible présente au sein d'ADN hétérologue dans un milieu comportant une ADN polymérase et des oligonucléotides amorces, ledit procédé comportant une étape de dénaturation thermique de l'ADN, une étape d'hybridation des oligonucléotides amorces sur l'ADN, et une étape de polymérisation enzymatique par l'ADN polymérase à partir desdites amorces, lesdites étapes étant répétées de façon cyclique et l'étape de polymérisation enzymatique générant notamment des produits d'amplification de longueur finie constitués de ladite séquence d'ADN bornée à chaque extrémité par un oligonucléotide amorce ou son complément, caractérisé en ce qu'au moment désiré après l'arrêt des cycles d'amplification, on rend lesdits produits d'amplification inaptes à une réamplification ultérieure et/ou avant le début de la réaction PCR, on met en oeuvre un prétraitement prévenant sélectivement la réamplification des produits d'amplifications antérieures résultant d'une réaction PCR utilisant les mêmes oligonucléotides amorces.

Ainsi, l'invention recouvre deux aspects qui peuvent être mis en oeuvre de manière cumulée ou alternative. Bien entendu, lorsque la réaction PCR est effectuée pour la première fois avec des oligonucléotides amorces donnés, il n'est pas nécessaire d'utiliser le prétraitement prévenant sélectivement la réamplification des produits d'amplification antérieures.

Pour rendre, à la fin d'une réaction PCR, les produits d'amplification inaptes à une réamplification ultérieure, on peut procéder de différentes façons, en utilisant des moyens plus ou moins destructeurs desdits produits d'amplification.

L'inactivation de ces produits peut tout d'abord être obtenue par destruction irréversible des produits d'amplification.

C'est pourquoi dans une première variante de l'invention, on procède à une destruction irréversible des produits d'amplification. Il peut
5 s'agir soit d'une destruction partielle de certaines portions du produit, suffisant à prévenir toute réamplification ultérieure, soit dans certaines conditions, d'une destruction totale.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, on provoque par voie chimique ou physique la destruction des oligonucléotides
10 amorces ou de leurs séquences complémentaires présents sur les produits d'amplification.

Dans le cas où on détruit les séquences oligonucléotidiques amorces elles-mêmes, il ne reste plus dans le milieu que des molécules comportant les séquences complémentaires des oligonucléotides amorces.
15 De telles molécules peuvent faire l'objet de multiplication arithmétique de type $x(n+1)$, mais pas d'une multiplication géométrique de type $x \cdot 2^n$ comme indiqué plus haut. Une telle répllication ne représente pas une compétition notable au regard de la réaction d'amplification complète et cette destruction partielle convient donc bien pour résoudre le problème posé par
20 l'invention.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise des oligonucléotides amorces qui comportent un ou plusieurs résidus riboses, un de ces résidus étant situé dans la moitié du côté 3' desdits oligonucléotides et au moment désiré pour l'arrêt des cycles d'amplifi-
25 cation, on met en oeuvre une étape de traitement à pH basique dans des conditions suffisantes pour cliver les produits d'amplification au niveau des résidus riboses des oligonucléotides amorces selon la figure 3.

Suivant un autre mode de réalisation, avantageux de l'invention, on utilise des oligonucléotides amorces qui comportent un agent dont
30 l'activation chimique ou photochimique entraîne une coupure dans la séquence complémentaire desdits oligonucléotides amorces, présente sur les produits d'amplification et identifiée comme séquence cible selon la figure 4.

De nombreux agents de ce type ont déjà été décrits, qui, fixés par intercalation dans un oligonucléotide, permettent la formation d'une nucléase artificielle. On peut citer trois grands groupes d'agents susceptibles d'être associés aux oligonucléotides amorces préalablement à l'amplification. Il s'agit des chélateurs organiques de cations métalliques, des photosensibilisateurs et des agents alkylants.

Les chélateurs organiques de cations métalliques, parmi lesquels on peut citer Fe-EDTA, Cu-phénanthroline, Fe-porphyrine, permettent de générer des radicaux OH[•] ou des dérivés oxométalliques qui, en présence d'un oxydant en particulier l'eau oxygénée, vont attaquer le ribose ou le désoxyribose et conduire à un clivage au niveau des liaisons phosphodiester qui enchaînent deux motifs successifs dans les brins d'acides nucléiques. Certains de ces complexes organométalliques sont aussi susceptibles d'induire directement ou indirectement des coupures dans l'ADN après irradiation lumineuse et non pas seulement par activation chimique.

Les photosensibilisateurs, par irradiation à des longueurs d'onde appropriées, induisent différents types de modification entre le sensibilisateur et l'acide nucléique qui est identifié comme séquence cible. Comme indiqué précédemment, certains photosensibilisateurs induisent des pontages covalents entre le sensibilisateur et l'acide nucléique. D'autres photosensibilisateurs sont au contraire connus pour induire des coupures dans la chaîne d'acide nucléique. Leur utilisation, conformément à l'invention, en association avec un oligonucléotide amorce qui va reconnaître la séquence complémentaire et l'identifier comme site de coupure, va conduire à la destruction de cette séquence complémentaire.

En tant que photosensibilisateur susceptible d'induire des coupures, on pourra utiliser par exemple la phénanthroline.

Tous ces oligonucléotides amorces modifiés conformément à l'invention peuvent être préparés de façon connue en soi, par exemple en utilisant le procédé décrit dans le brevet US 4 835 263.

L'invention a donc également pour objet des oligonucléotides destinés à servir d'amorce dans un procédé PCR, qui comprennent un ou plusieurs résidus riboses, ou encore qui comprennent un agent dont l'activation chimique ou physique entraîne une coupure dans la séquence complémentaire desdits oligonucléotides.

Dans une seconde variante, le procédé selon l'invention est caractérisé par le fait que pour rendre lesdits produits d'amplification inaptes à une réamplification ultérieure, on forme sous l'effet d'une activation chimique ou physique, un pontage covalent entre les deux brins
5 des produits d'amplification.

Ce pontage covalent donne naissance à un nouveau produit bicaténaire, stabilisé par la liaison covalente qui interdit toute dénatura-
10 tion complète du fragment d'ADN. La première étape du cycle d'amplification ne peut donc avoir lieu. Ce produit peut éventuellement être utilisé ultérieurement et constitue un autre objet de l'invention.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, on forme ladite liaison covalente en utilisant des oligonucléotides amorces comportant un agent dont l'activation chimique ou physique conduit à la
15 formation d'un pontage covalent entre l'oligonucléotide du produit d'amplification formé et un brin d'ADN complémentaire selon la figure 2.

Tout agent activable chimiquement ou physiquement, notamment photochimiquement peut être utilisé à cette fin, dès lors qu'il n'interfère pas avec la capacité des oligonucléotides amorces à s'hybrider normalement
avant leur activation.

20 Lorsqu'on utilise des photosensibilisateurs, ils peuvent être choisis parmi les dérivés du psoralène, du dansyl, et de l'éthyidium.

Plus particulièrement, on peut citer les psoralènes et leurs dérivés.

L'invention a également pour objet ces oligonucléotides amorces
25 tels que modifiés.

Tous les oligonucléotides objets de l'invention peuvent être utilisés pour la confection d'une trousse utilisable pour la mise en oeuvre d'un procédé PCR, c'est-à-dire contenant tous les réactifs nécessaires pour le cycle réactionnel.

30 Lorsqu'on souhaite faire appel à cette technique, dans des circonstances telles que le diagnostic ou le pronostic médical, où il est impératif de s'affranchir le plus possible de risques de contamination, on peut avantageusement utiliser une telle trousse, qui constitue également un objet de l'invention.

Pour la prévention sélective de la réamplification de produits d'amplifications antérieures éventuellement présents dans le milieu réactionnel, un mode de réalisation avantageux consiste à traiter lesdits produits d'amplifications antérieures par une quantité appropriée d'au
5 moins une exonucléase.

Les exonucléases sont des enzymes capables de dégrader l'ADN de façon séquentielle, en partant soit de l'extrémité 5', soit de l'extrémité 3'.

Cet aspect de l'invention repose sur l'observation, déjà
15 mentionnée, de la différence de structure et de longueur entre les produits d'amplification indésirables à ce stade, et les molécules d'ADN à analyser. Les produits d'amplifications antérieures sont caractérisés à leurs extrémités par la présence des séquences amorces ayant permis les initiations de l'amplification. En revanche, les molécules d'ADN à analyser
15 contiennent les séquences cibles - et donc les séquences qui vont s'hybrider aux séquences amorces - réparties statistiquement le long de molécules de taille variant approximativement de 0,5 à 20 Kb. Une attaque exonucléasique d'une centaine ou de quelques centaines de bases aura donc pour effet de détruire totalement un produit d'amplification contaminant tout en
20 préservant la grande majorité des séquences cibles pouvant se trouver dans l'échantillon à analyser.

Différents types d'exonucléases peuvent être utilisées. On peut citer les exonucléases qui attaquent l'ADN à partir de ses extrémités 5' (exonucléases 5'). Dans ce cas, le traitement supprime les séquences
25 amorces et maintient leurs séquences complémentaires, pouvant faire l'objet uniquement de multiplications linéaires. On peut citer également les exonucléases 3' qui suppriment les séquences complémentaires des amorces, supprimant ainsi de façon particulièrement avantageuse, toute possibilité d'amplification.

30 Suivant le type d'exonucléase utilisé, les conditions de leur introduction dans le mélange réactionnel sont plus ou moins contraignantes. En effet, certaines exonucléases ne sont pas spécifiques de l'ADN

bicaténaire ou digèrent simultanément les deux brins d'ADN en partant de ses extrémités. Dans ce cas, il est préférable de contrôler de façon précise la digestion exonucléatique et de redéfinir ses paramètres pour chaque nouvelle mise en oeuvre. Ceci signifie que ses paramètres doivent à chaque fois être adaptés à la nature de l'échantillon à analyser, à la façon dont l'ADN a été extrait, à sa concentration, aux conditions de la réaction, etc.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise des exonucléases spécifiques de l'ADN bicaténaire. Ce type d'exonucléases digère les extrémités des molécules d'ADN, ce qui n'a pas d'effet sur les molécules cibles. En effet, l'un des brins de la cible peut être détruit, mais le brin complémentaire, portant également la séquence cible, est par définition, préservé. De plus, même si le traitement exonucléasique est poursuivi de façon exhaustive, ou en présence de grandes quantités d'enzymes, la dégradation s'arrête lorsque le milieu ne contient plus de molécules d'ADN bicaténaires. A ce moment là, par définition, la moitié des séquences sont digérées, ce qui a pour effet de diviser simplement par deux le nombre de séquences cibles. Par conséquent, même si un traitement exonucléasique est poursuivi très largement au delà de ce qui est nécessaire pour neutraliser des produits d'amplification, la possibilité de détecter la séquence cible n'est nullement affectée puisque la cible est toujours présente après digestion au minimum à un nombre d'exemplaires moitié du nombre contenu dans l'échantillon de départ.

L'utilisation de ce type d'exonucléases est donc particulièrement avantageux dans la mesure où il permet d'éviter un contrôle rigoureux de la digestion exonucléasique. De plus, il permet d'effectuer le traitement exonucléasique sur la totalité du mélange réactionnel, contenant déjà les oligonucléotides amorces.

Comme exonucléases de ce type, on peut citer, de façon non exhaustive, l'exonucléase III, qui catalyse la libération de 5' mono-nucléotides à partir des extrémités 3' OH et n'est pas active sur l'ADN monocaténaire.

En pratique, il suffit de définir les conditions de la digestion exonucléasique afin d'obtenir une digestion de 20 nucléotides environ. En

effet, dans ces conditions, on évite tout risque de destruction de la cible de l'amplification car même s'il n'est pas toujours possible d'obtenir une digestion rigoureusement synchrone de toutes les molécules et si certaines font l'objet de dégradations plus importantes, de l'ordre de quelques
5 centaines de bases, cela n'a pas d'effet notable sur la capacité d'amplification des molécules cibles.

Plus précisément, le traitement par les exonucléases comporte avantagement les étapes suivantes :

- a) mélange des composants de la réaction PCR,
- 10 b) addition de l'exonucléase en quantité appropriée,
- c) incubation à 37°C pendant un temps suffisant à la dégradation,
- d) passage à température élevée pendant au moins 5 minutes.

Ensuite, les cycles d'amplification sont mis en oeuvre dans les
15 conditions habituelles. L'étape d) s'effectue de préférence à une température supérieure à 90°C ; elle permet à la fois la dénaturation de l'ADN pour initier les cycles d'amplification et la dégradation irréversible de l'activité exonucléasique.

L'invention a également pour objet une trousse pour la mise en
20 oeuvre d'un procédé PCR comportant une étape de prétraitement des échantillons à analyser par une exonucléase, qui comprend une quantité appropriée d'au moins une exonucléase.

Bien entendu, il est également possible d'utiliser la digestion exonucléasique, dans des conditions très ménagées, comme traitement final
25 à la fin d'une réaction PCR. Ce traitement ménagé a pour effet de détruire les séquences de reconnaissance des amorces tout en conservant les séquences amplifiées. Toutefois, à ce stade, un contrôle beaucoup plus fin des conditions de la digestion exonucléasique est nécessaire pour respecter l'intégrité des séquences internes des produits d'amplification.

30 D'une façon générale, toutes les variantes envisageables conformément à l'invention peuvent être mises en oeuvre de façon séparée ou combinée, en ce qui concerne aussi bien les différentes variantes de procédé que les différents types d'oligonucléotides amorces que l'on peut préparer.

Les exemples suivants illustrent l'invention de façon non limitative.

Exemple 1

Amplification in vitro (PCR) à l'aide d'oligonucléotides amorces
5 comportant un ou plusieurs résidus ribonucléotidiques.

On synthétise par voie chimique des oligonucléotides amorces "mixtes" dont certaines des bases sont des ribonucléotides. Ces amorces ont une longueur de 20 bases et deux résidus riboses sont incorporés dans chacun d'entre eux en positions 17 et 18 ou 20 et 21, c'est-à-dire à
10 proximité du côté 3' des amorces.

Ces amorces sont complémentaires à des séquences présentes dans le gène gag du virus HIV-1 et permettent d'amplifier un fragment de 214 paires de bases.

A titre de témoin, on effectue la synthèse d'amorces standards,
15 de même séquence, mais ne comportant que des résidus déoxyribonucléotidiques.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour ces expériences ainsi que la position précise des résidus ribonucléotidiques sont indiqués ci-dessous :

20 Amorce 1 (LAV-1) : GGC AAA TGG TAC ATC AGG CCA TAT C
Amorce 2 (LAV-2) : TCT GCA GCT TCC TCA TTG ATG GTC T

Les réactions d'amplifications sont effectuées sur 1 µg d'ADN extrait de lymphocytes humains infectés par le virus HIV -1, dans un milieu réactionnel de 100 µl contenant 100 ng de chaque amorce, avec les quatre
25 dXTP (déoxyribonucléotide triphosphate), en présence de 2,5 unités d'ADN polymérase Taq I.

Après 30 cycles d'amplification (dénaturation à 92°C, hybridation à 45°C, élongation à 72°C), un sonde (marquées au 32P) spécifique de la séquence amplifiée est ajoutée au milieu et les produits de l'hybridation en milieu liquide ainsi obtenus sont visualisés par autoradiographie après
30 séparation sur un gel de polyacrylamide 6 %.

Cette technique permet tout à la fois de visualiser très précisément, au nucléotide près, la taille du produit amplifié et de contrôler, grâce à la réaction d'hybridation avec la sonde, que l'amplification

s'est bien effectuée au niveau de la séquence choisie et a abouti à l'amplification de la séquence prévue. C'est donc une technologie précise permettant de bien évaluer l'efficacité d'une réaction d'amplification en donnant des informations qualitatives et quantitatives sur la nature du produit amplifié.

Les réactions d'amplification menées en parallèle avec les amorces normales oligo/déoxynucléotidiques ou mixtes oligo/ribo/déoxynucléotidiques sont menées comme décrit ci-dessus et les produits respectifs provenant de ces amplifications analysés par hybridation et gel.

La première observation que l'on peut faire est que les efficacités d'amplification sont les mêmes dans les deux cas et aboutissent à la formation de produits d'amplification semblables, de même taille, présentant la même intensité d'hybridation avec la sonde. La présence de résidus ribonucléotidiques dans les amorces n'a donc pas d'effets sur leur aptitude à amorcer des élongations par la polymérase TaqI et permet des amplifications de même efficacité.

Une seconde observation que l'on peut également tirer de cette première expérience est que le produit d'amplification obtenu avec les amorces mixtes est composé d'un élément largement majoritaire (plus de 90 %) correspondant à la taille de la bande d'amplification prévue, mais comporte également un produit très minoritaire, de séquence plus courte de 18 nucléotides. Ce second produit minoritaire correspond en fait à un produit d'amplification délété, à l'une de ses extrémités, de la séquence amorce comportant les résidus riboses. Tout se passe dans ce cas comme si le milieu de réaction comporte une faible activité RNasique endogène qui a pour effet de libérer spontanément une fraction des amorces en coupant l'ADN amplifié au niveau des résidus ribonucléotidiques.

Dans la seconde expérience, c'est délibérément que l'on traite cette fois les deux échantillons après amplification pour cliver les produits d'amplification comportant des résidus riboses. Le traitement après les 30 cycles d'amplification consiste à ajouter NaOH qsp 0,1 M, puis après une incubation de 15 minutes à 90°C, à neutraliser le milieu par une addition de HCl, 0,17 M, et précipitation à l'éthanol.

Dans ces conditions de pH basique, il est connu que les oligoribonucléotides subissent spécifiquement une dégradation appelée hydrolyse alcaline et aboutissant à la rupture de la liaison phosphodiester.

Après ce traitement, effectué en parallèle sur les deux séries d'amplification, avec les amorces normales et les amorces mixtes oligo/ribo/déoxynucléotidiques, les produits d'amplification sont soumis à la même analyse que celle décrite ci-dessus.

Dans ce cas, on observe que les produits d'amplification obtenus avec les amorces mixtes présentent une longueur inférieure de 18 nucléotides aux produits d'amplification obtenu avec les amorces normales. Ce résultat démontre que le traitement par NaOH, c'est-à-dire par hydrolyse alcaline permet le clivage à 100 % des produits d'amplification comportant un résidu ribonucléotidique au niveau des séquences amorces.

La troisième expérience vise à vérifier que les produits d'amplifications obtenus avec des amorces mixtes comportant des résidus ribonucléotidiques ne peuvent plus faire l'objet d'amplification ultérieures. Dans ce cas, les produits d'amplifications obtenus après amplification avec amorces normales ou avec amorces mixtes (ribo/deoxy) et traités ou non par NaOH sont purifiés, isolés et soumis à une nouvelle amplification.

Les produits de cette amplification sont analysés dans les conditions décrites ci-dessus et les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Nature des amorces de l'amplification primaire	normales		mixtes (ribo/déoxy)	
	-	+	-	+
Traitement par NaOH après amplification primaire	-	+	-	+
Obtention d'un produit d'amplification secondaire	+	+	+	-

Les résultats de cette expérience montrent que les produits d'amplifications obtenus à l'aide d'amorces comportant des résidus ribonucléotidiques ne sont plus amplifiables si la réaction d'amplification est suivie par une réaction d'hydrolyse alcaline. Ceci montre bien que
5 d'éventuelles contaminations issues de telles amplifications ne présentent pas le risque de donner des faux positifs au cours de cycles d'amplifications ultérieures.

Exemple 2

15 Etude des effets de la digestion par l'exonucléase III sur des produits d'amplification contaminants

Dans une première expérience, on effectue une cinétique de digestion par de l'exonucléase III sur un mélange de deux fragments d'ADN longs de 5000 et de 300 paires de bases et l'on suit les effets de la
15 digestion par analyse sur gel et coloration au bromure d'éthidium. La digestion est effectuée dans le tampon utilisé usuellement pour effectuer les amplifications.

On voit que le fragment de 300 pdb disparaît au bout de 5 minutes de digestion mais que le fragment de 5000 pdb voit tout d'abord sa
20 taille décroître entre 5 et 10 minutes de digestion pour être ensuite converti de façon stable en ADN monocaténaire à partir de 20 minutes. Le produit de digestion obtenu à ce moment n'est pas modifié par une incubation plus prolongée avec l'enzyme.

Cette expérience montre qu'une incubation prolongée d'ADN en
25 présence d'exonucléase III dans le tampon d'amplification ne dégrade pas ces molécules d'ADN mais aboutit à un équilibre où l'ADN monocaténaire est stable même pendant des incubations longues. Elle confirme également que cette digestion déstabilise plus rapidement les courtes molécules (comme le sont les produits d'amplification) que les longues (comme le sont
30 les molécules d'ADN cible).

Dans une seconde expérience, on effectue une amplification sur de l'ADN génomique humain en utilisant les amorces PCO2, Nature, (1986) 324, p.163-166 et PCO4, Science, (1985) 280, p. 1350-1354 qui permettent d'amplifier un fragment du gène globine et l'on isole la bande ainsi produite qui est utilisée comme agent de contamination artificiel.

On prépare alors deux séries de tubes, l'un comportant 1 µg d'ADN humain et l'autre 1 µg d'ADN plasmidique linéaire ne contenant pas de séquences amplifiables par les amorces utilisées plus 0,01 pg d'ADN contaminant. Ces deux séries sont traitées par 10 u d'exonucléase III pendant 0, 5, 10, 20, 40 et 60 mn puis soumises à amplification dans des conditions usuelles.

La détection des produits d'amplification s'effectue par électrophorèse directe sur gel d'agarose 1,4 % et coloration au bromure d'éthidium.

Les résultats de cette expérience sont les suivants :

	Présence du produit amplifié					
Digestion par l'exonucléase III	0	5	10	20	40	60 (minutes)
ADN génomique	+	+	+	+	+	+
ADN contaminant	+	-	-	-	-	-

Ces résultats montrent 1) qu'une digestion même poussée d'ADN génomique par de l'exonucléase III ne modifie pas le potentiel amplifiable d'une cible donnée, unique, au sein de cet ADN mais que 2) le même traitement appliqué à un produit amplifié, purifié (donc équivalent à un contaminant potentiel) et introduit comme contaminant artificiel dans le milieu, détruit sa capacité à être amplifié après les premières minutes de digestion.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'amplification enzymatique in vitro (procédé PCR) d'une séquence d'ADN cible présente au sein d'ADN hétérologue dans un milieu comportant une ADN polymérase et des oligonucléotides amorces, ledit procédé comportant une étape de dénaturation thermique de l'ADN, une étape d'hybridation des oligonucléotides amorces sur l'ADN, et une étape de polymérisation enzymatique par l'ADN polymérase à partir desdites amorces, lesdites étapes étant répétées de façon cyclique et l'étape de polymérisation enzymatique générant notamment des produits d'amplification de longueur finie constitués de ladite séquence d'ADN bornée à chaque extrémité par un oligonucléotide amorce ou son complément, caractérisé en ce qu'au moment désiré après l'arrêt des cycles d'amplification, on rend lesdits produits d'amplification inaptés à une réamplification ultérieure et/ou avant le début de la réaction PCR, on met en oeuvre un prétraitement prévenant sélectivement la réamplification de produits d'amplifications antérieures résultant d'une réaction PCR utilisant les mêmes oligonucléotides amorces.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que pour rendre lesdits produits d'amplification inaptés à une réamplification ultérieure, on provoque par activation chimique ou physique la destruction des oligonucléotides amorces ou de leurs séquences complémentaires présents sur les produits d'amplification.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on utilise des oligonucléotides amorces qui comportent un ou plusieurs résidus riboses, un de ces résidus étant situé dans la moitié du côté 3' desdits oligonucléotides et au moment désiré pour l'arrêt des cycles d'amplification, on met en oeuvre une étape de traitement à pH basique dans des conditions suffisantes pour cliver les produits d'amplification au niveau des résidus riboses des oligonucléotides amorces.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise des oligonucléotides amorces qui comportent un agent dont l'activation chimique ou physique entraîne une coupure dans la séquence complémentaire desdits oligonucléotides amorces présente sur les produits d'amplification et identifiée comme séquence cible.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit agent est choisi parmi les chélateurs organiques de cations métalliques, les photosensibilisateurs et les agents alkylants.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit agent est un chélateur organique de cations métalliques choisi parmi Fe-EDTA, Cu-phénanthroline, Fe-porphyrine, l'activation étant réalisée par l'ajout d'une quantité efficace d'eau oxygénée.

7. Oligonucléotide destiné à servir d'amorce dans un procédé PCR, caractérisé en ce qu'il comprend un ou plusieurs résidus riboses.

8. Oligonucléotide destiné à servir d'amorce dans un procédé PCR, caractérisé en ce qu'il comprend un agent dont l'activation chimique ou physique entraîne une coupure dans la séquence complémentaire dudit oligonucléotide.

9. Produit d'amplification issu d'un procédé PCR, constitué de la séquence d'ADN bicaténaire destinée à être amplifiée, bornée par deux oligonucléotides amorces, ou leurs compléments, caractérisé en ce qu'une partie de la séquence complémentaire des oligonucléotides amorces est détruite.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour rendre lesdits produits d'amplification inaptes à une réamplification ultérieure, on forme, sous l'effet d'une activation chimique ou physique, un pontage covalent entre les deux brins des produits d'amplification.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que, on utilise des oligonucléotides amorces comportant un agent dont l'activation chimique ou physique conduit à la formation d'un pontage covalent entre l'oligonucléotide du produit d'amplification formé et un brin d'ADN complémentaire.

12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que ledit agent est un photosensibilisateur choisi parmi les dérivés de la proflavine, du dansyl, de l'éthydiuim, des psoralènes.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit agent est choisi parmi les psoralènes et leurs dérivés.

14. Oligonucléotide destiné à servir d'amorce dans un procédé PCR, caractérisé en ce qu'il comprend un agent dont l'activation chimique ou physique conduit à la formation d'un pontage covalent entre ledit oligonucléotide et un brin d'ADN complémentaire.

5 15. Produit d'amplification issu d'un procédé PCR, constitué de la séquence d'ADN bi-caténaire destinée à être amplifiée, bornée par deux oligonucléotides amorces, ou leurs compléments caractérisé en ce que les deux chaînes sont liées par une liaison covalente.

16. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que avant
15 le début de la réaction PCR, on traite lesdits produits d'amplifications antérieures par une quantité appropriée d'au moins une exonucléase.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on utilise une exonucléase spécifique de l'ADN bicaténaire.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on
15 utilise l'exonucléase III.

19. Procédé selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce qu'il comprend, avant le début de la réaction PCR, les étapes suivantes :

20 a) mélange des composants de la réaction PCR,
b) addition de l'exonucléase en quantité appropriée,
c) incubation à 37°C pendant un temps suffisant à la dégradation,

d) passage à température élevée pendant au moins 5 minutes.

25 20. Trousse pour la mise en oeuvre d'un procédé PCR, caractérisée en ce qu'elle comprend des oligonucléotides selon l'une des revendications 7, 8 ou 14.

21. Trousse pour la mise en oeuvre d'un procédé PCR selon l'une des revendications 16 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité appropriée d'au moins une exonucléase.

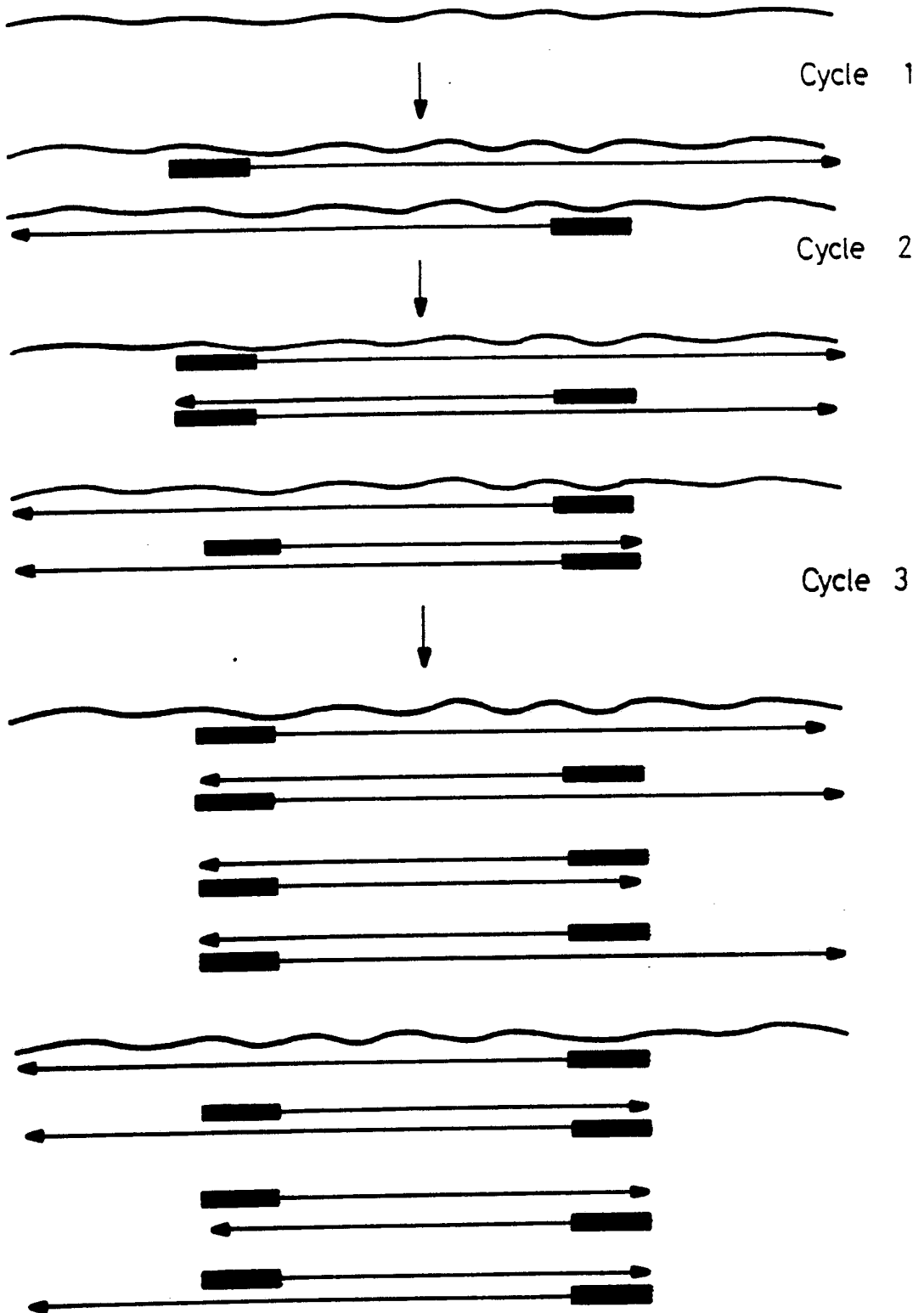
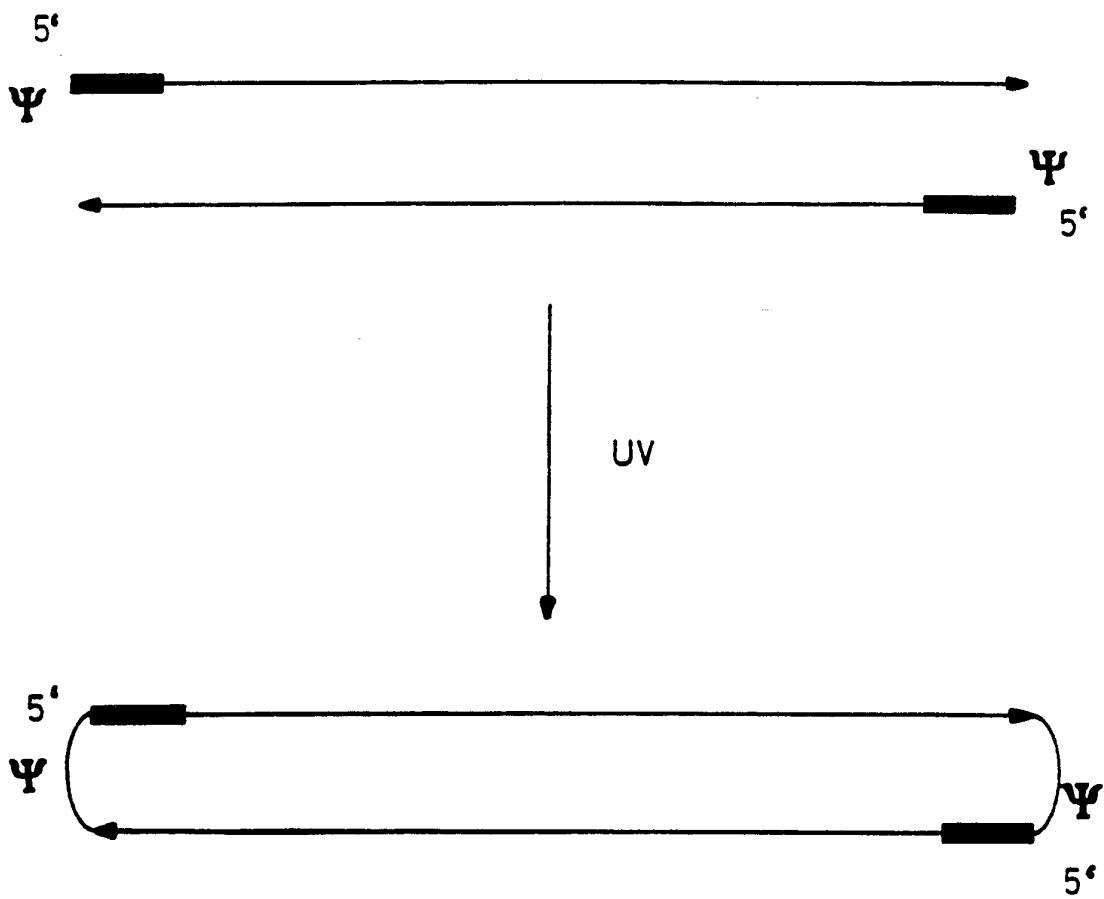
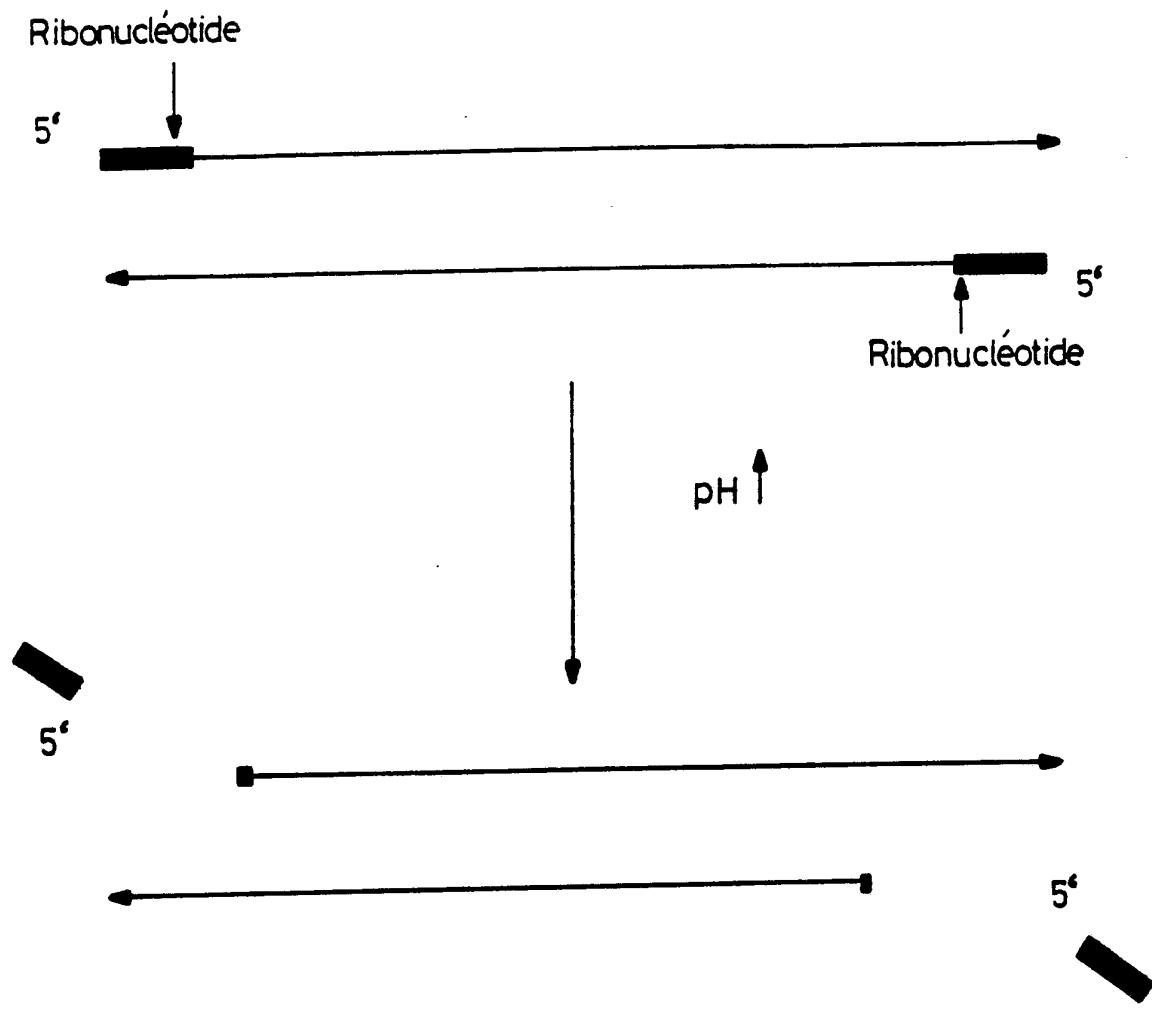


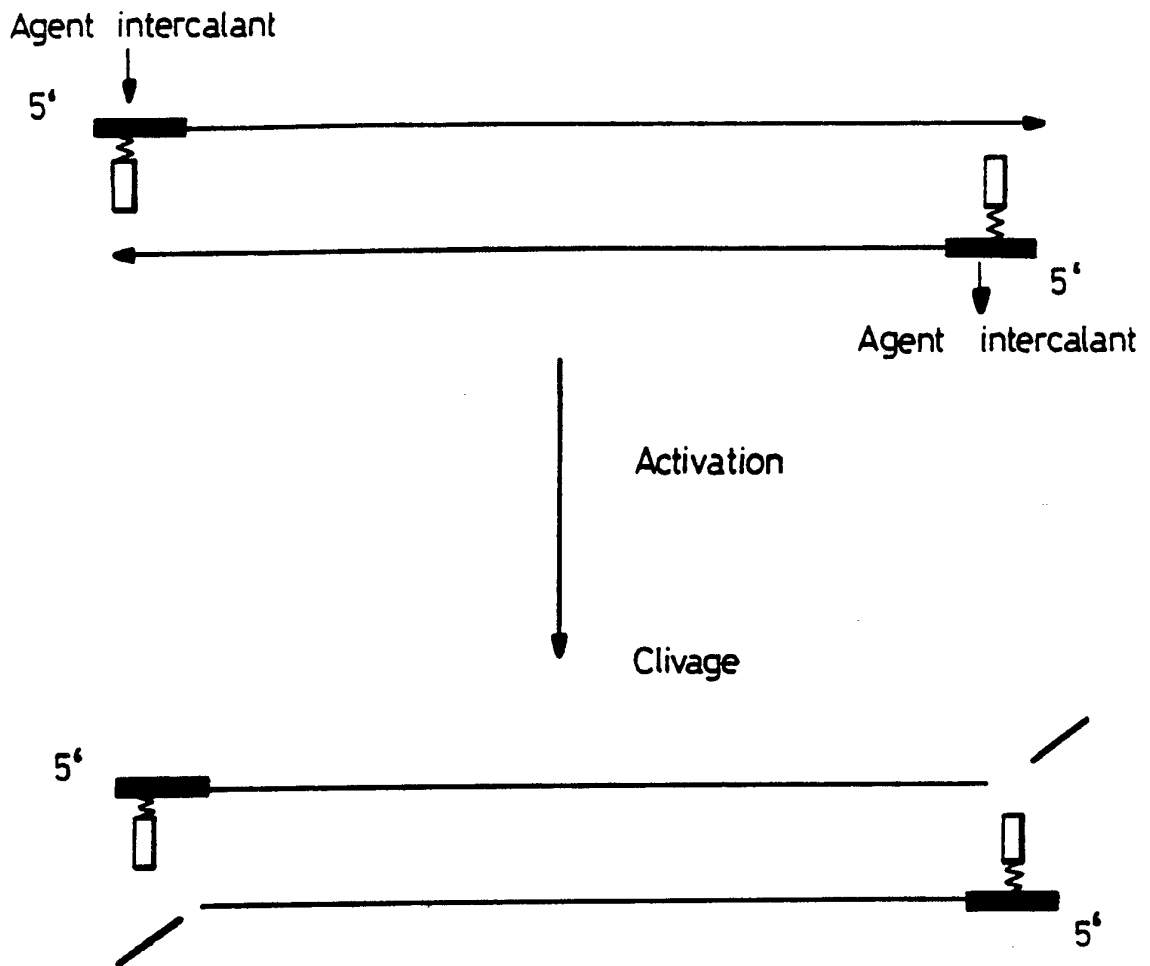
FIG-1



FIG_2



FIG_3



FIG_4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00513

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ C 12 Q 1/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	C 12 Q	
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 ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	WO, A, 9001563 (G.D. CIMONO et al.) 22 February 1990, see page 17, line 1 - page 19, line 20; claims 6, 23-26	14
A	---	1,10-13,15
A	WO, A, 8909284 (UNIVERSITY OF IOWA) 5 October 1989, see page 15, lines 26-30; page 16, lines 8-24; page 41, lines 7-12; claims 25,26,36	7
X	WO, A, 8911548 (CEIUS CORP.) 30 November 1989, see page 31, line 10 - page 32, line 3	1,2,16
A	Nucleic Acids Research, vol. 17, No. 14, 25 July 1989, IRL Press, R.G. Higuchi et al.: "Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction", page 5865, see lines 9-18	1,2,16-19, 8,9
	---	-/-
<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	
30 September 1991 (30.09.91)	29 October 1991 (29.10.91)	
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
A	Nature, vol. 343, 4 January 1990, G.Sarkar et al.: "Shedding light on PCR contamination", page 27, see the whole article	1,2,16-19, 10,15
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 82, February 1985, G.B. Dreyer et al.: "Sequence-specific cleavage of single- stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA-Fe (II)", pages 968- 972, see abstract	4-9
A	WO, A, 9006376 (SALK INSTITUTE) 14 June 1990, see page 20, lines 1-30	7
P,X	Nucleic Acids Research, vol.18, No. 22, 1990, Y. Jinno et al.: "Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR", page 6739, see the whole article	1,10-15
P,X	WO, A, 9012115 (COLLABORATIVE RESEARCH, INC.) 18 October 1991, see page 29, line 26 - page 30, line 11	1,16-19
P,X	EP, A, 0401037 (LIFE TECHNOLOGIES, INC) 5 December 1990, see the whole document	1
P,X	Nucleic Acids Research, vol. 19, No. 1, G.D. Cimino et al.: "Post-PCR sterilization; a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction", pages 99-107, see the whole article	1,10-15
P,X	EP, A, 0415755 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 6 March 1991, see the whole document	1,2
E	EP, A, 0407291 (INST. PASTEUR) 9 January 1991, see the whole document	1,2,16-19

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

FR 9100513
SA 48905

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 22/10/91
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- 9001563	22-02-90	AU-A- 4181089	05-03-90
WO-A- 8909284	05-10-89	AU-A- 3294489 EP-A- 0365627	16-10-89 02-05-90
WO-A- 8911548	30-11-89	AU-A- 3754289 EP-A- 0451141	12-12-89 16-10-91
WO-A- 9006376	14-06-90	CA-A- 2004574 EP-A- 0446305	05-06-90 18-09-91
WO-A- 9012115	18-10-90	AU-A- 5358990 AU-A- 5640090 WO-A- 9011372	22-10-90 05-11-90 04-10-90
EP-A- 0401037	05-12-90	US-A- 5035996 JP-A- 3058785	30-07-91 13-03-91
EP-A- 0415755	06-03-91	JP-A- 3091484	17-04-91
EP-A- 0407291	09-01-91	FR-A- 2649122 AU-A- 5957790 WO-A- 9100363	04-01-91 17-01-91 10-01-91

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	Nucleic Acids Research, vol. 17, no. 14, 25 juillet 1989, IRL Press, R.G. Higuchi et al.: "Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction", page 5865, voir lignes 9-18 ---	1,2,16- 19,8,9
A	Nature, vol. 343, 4 janvier 1990, G. Sarkar et al.: "Shedding light on PCR contamination", page 27, voir l'article en entier ---	1,2,16- 19,10, 15
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 82, février 1985, G.B. Dreyer et al.: "Sequence-specific cleavage of single-stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA-Fe(II)", pages 968-972, voir le résumé ---	4-9
A	WO,A,9006376 (SALK INSTITUTE) 14 juin 1990, voir page 20, lignes 1-30 ---	7
P,X	Nucleic Acids Research, vol. 18, no. 22, 1990, Y. Jinno et al: "Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR", page 6739, voir l'article en entier ---	1,10-15
P,X	WO,A,9012115 (COLLABORATIVE RESEARCH, INC.) 18 octobre 1991, voir page 29, ligne 26 - page 30, ligne 11 ---	1,16-19
P,X	EP,A,0401037 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 5 décembre 1990, voir le document en entier ---	1
P,X	Nucleic Acids Research, vol. 19, no. 1, G.D. Cimino et al.: "Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction", pages 99-107, voir l'article en entier ---	1,10-15
P,X	EP,A,0415755 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 6 mars 1991, voir le document en entier ---	1,2
E	EP,A,0407291 (INST. PASTEUR) 9 janvier 1991, voir le document en entier -----	1,2,16- 19

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

FR 9100513
SA 48905

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 22/10/91
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- 9001563	22-02-90	AU-A- 4181089	05-03-90
WO-A- 8909284	05-10-89	AU-A- 3294489 EP-A- 0365627	16-10-89 02-05-90
WO-A- 8911548	30-11-89	AU-A- 3754289 EP-A- 0451141	12-12-89 16-10-91
WO-A- 9006376	14-06-90	CA-A- 2004574 EP-A- 0446305	05-06-90 18-09-91
WO-A- 9012115	18-10-90	AU-A- 5358990 AU-A- 5640090 WO-A- 9011372	22-10-90 05-11-90 04-10-90
EP-A- 0401037	05-12-90	US-A- 5035996 JP-A- 3058785	30-07-91 13-03-91
EP-A- 0415755	06-03-91	JP-A- 3091484	17-04-91
EP-A- 0407291	09-01-91	FR-A- 2649122 AU-A- 5957790 WO-A- 9100363	04-01-91 17-01-91 10-01-91

EPO FORM P0472

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