(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 691 162**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **92 05718**

(51) Int Cl[5] : C 12 Q 1/68, 1/70, G 01 N 33/569

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 12.05.92.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 19.11.93 Bulletin 93/46.

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

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

(71) **Demandeur(s) :** *AREMAS (ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE, L'ETUDE, LE TRAITEMENT ET LA PREVENTION DES MALADIES MALIGNES DU SANG, dite:) (Association loi de 1901)* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Andrieu Jean-Marie et Lu Wei.

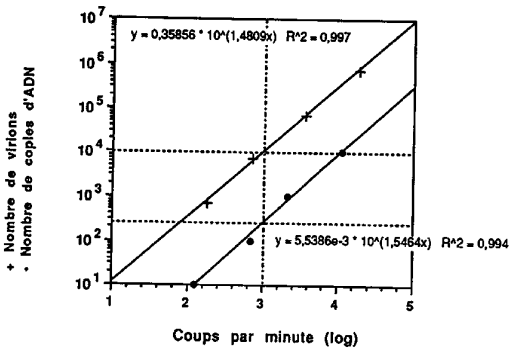
(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Cabinet Leboyer.

(54) Moyen pour le dosage quantitatif de rétrovirus, procédé pour sa préparation et kit de diagnostic comportant ledit moyen.

(57) L'invention concerne le diagnostic des maladies à rétrovirus.

Dans le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro, comprenant desmoyens pour la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquide et des moyens pour l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne, on met en œuvre un moyen de quantification des résultats composé d'un étalon externe formé par des prélèvements de cultures de cellules infectées par des quantités déterminées dudit rétrovirus titrées en leur protéine virale de référence (ou "protéine de core"), lesdits prélèvements étant distribués dans du liquide indemne de ce virus, dosé en parallèle avec le sérum à tester.



FR 2 691 162 - A1

La présente invention concerne le diagnostic des maladies dues à des rétrovirus chez l'homme et l'animal, notamment le diagnostic de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Les rétrovirus font partie de la famille des Retroviridae et sont des virus à ARN qui, grâce à leur transcriptase réverse ou inverse (ci-après en abrégé "TR"), peuvent transcrire leur génome ARN en ADN. Un rétrovirus est ainsi à même de s'introduire dans les cellules qui l'hébergent, sous forme d'ADN chromosomique ou extra-chromosomique. Il en résulte qu'un rétrovirus existe sous deux formes:

- sous forme libre, comme élément génétique mobile à ARN, pouvant passer d'une cellule à une autre;
- sous forme cellulaire rétrotranscrite en ADN, ce qui constitue la forme nécessaire à sa multiplication.

Selon la classification actuelle, la famille des rétrovirus est divisée en trois sous-familles: les Oncovirinae, les Spumavirinae et les Lentivirinae.

Pour plus de clarté, les explications qui suivent et les détails pratiques de l'invention qui sera exposée plus loin sont fournis en référence au rétrovirus VIH, qui fait partie de la famille des Lentivirinae.

Mais ce qui est dit ou démontré à propos de ce virus s'applique mutatis mutandis aux autres rétrovirus. Il est donc entendu que la présente demande de brevet n'est pas limitée au rétrovirus de l'immunodéficience humaine et que c'est simplement dans un souci de simplification de l'exposé et/ou des indications méthodologiques qu'il est principalement fait référence à celui-ci.

L'importance du diagnostic des infections par rétrovirus et la problématique y relative sont résumées ci-après:

La quasi-totalité des personnes séropositives pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) évolue vers le SIDA dans un délai de 3 à 15 ans après la contamination.

L'évolution du SIDA reste jusqu'à présent fatale dans tous les cas.

Les objectifs actuels de l'homme du métier s'intéressant à la mise au point de remèdes ou de vaccins, de méthodes de traitement et/ou de procédés de diagnostic sont:

- l'évaluation du pronostic de chaque sujet séropositif, à savoir l'appréciation de ce que l'on est en présence chez ce sujet soit d'une évolution rapide vers le SIDA, soit au contraire d'une longue stabilité de l'infection; et
- l'évaluation dans un court délai de l'efficacité d'un médicament chez un sujet séropositif. En effet, jusqu'à présent cette évaluation nécessite un très grand

nombre de patients et une longue surveillance, du fait que les critères d'évaluation retenus pour un traitement sont le déclenchement du SIDA ou la mort, événements qui surviennent après des années d'évolution chez un sujet séropositif.

Les travaux de recherche de ces dernières années ont conduit, pour répondre à ces deux objectifs, à chercher à évaluer la quantité de virus elle-même présente dans l'organisme, soit sous forme de virus rétrotranscrit sous forme d'ADN dans les cellules circulantes du sang et particulièrement dans les cellules T4, soit sous forme de virus libre dans le sérum des patients (sous forme d'ARN).

On connaît actuellement deux types de techniques pour mesurer la concentration virale.

Une technique de coculture permet de mesurer in vitro le pourcentage de cellules infectées du sang. Ce pourcentage est faible (inférieur à 1/30 000) chez les personnes séropositives qui resteront stables et asymptomatiques pendant les deux ou trois années suivantes, mais au contraire élevé (supérieur à 1/3000) chez les personnes séropositives qui vont évoluer rapidement vers le SIDA. L'étude de ces pourcentages permet aussi de suivre l'efficacité d'un médicament.

Mais cette technique de culture présente des inconvénients. Elle nécessite en particulier un laboratoire habilité pour des cultures virales actives, dit de type P3. De plus, les manipulations correspondant à la culture peuvent durer jusqu'à 30 jours, ce qui est évidemment trop long pour un examen de laboratoire important, éventuellement utilisable en routine chez de nombreux sujets.

Un deuxième type de technique est la mesure de l'ADN viral des cellules. La mesure de cet ADN se fait par un processus d'amplification physico-chimique utilisant la technique, bien connue de nos jours, de réaction de polymérase en chaîne (couramment dénommée en abrégé "PCR" en référence à l'expression anglaise "Polymerase Chain Reaction"). [Voir par exemple Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction par H.A. Erlich et al., Science, vol. 252 (1991), pages 1643-1650]. Compte tenu de la faible reproductibilité de la PCR d'une expérience à l'autre, la mesure doit se faire en présence d'un standard ou étalon, qui est introduit dans chaque expérience sous la forme de plasmides à différentes concentrations contenant chacune une seule copie de l'ADN viral. Selon cette technique (décrite par exemple par J.W. Shih et al. dans The Journal of Infectious Diseases, 1990: 162, pages 1025-1030), en mesurant en même temps l'ADN viral issu de ces différentes concentrations de plasmides et les prélèvements issus de patients, on s'assure que les caractéristiques de la PCR sont identiques au sein d'une même manipulation. Ainsi, au moyen d'une droite de référence obtenue geâce

aux concentrations d'ADN viral plasmidique, on peut mesurer l'ADN viral présent dans l'échantillon. La mesure de l'ADN viral grâce à la PCR permet de fixer le pronostic individuel et d'étudier l'efficacité d'un médicament utilisé dans un traitement en cours de la même façon que le pourcentage de cellules infectées. Cette technique demande une expertise en PCR, mais elle ne nécessite pas de laboratoire habilité de type P3 et une trentaine de prélèvements peuvent être traités en 2 ou 3 jours. La coculture aussi bien que la mesure de l'ADN cellulaire ne permettent pas de mesurer la quantité de virus produite dans l'organisme, mais seulement celle du virus rétrotranscrit dans les cellules.

La mesure de la concentration du virus dans le sérum a un intérêt majeur, car il s'agit à travers elle du reflet réel du processus de production du virus par les cellules et du processus de destruction du virus par différents mécanismes, la concentration du virus du sérum étant alors la résultante de ces deux processus.

Il y avait donc un besoin pour parvenir à la détermination de ce type de paramètre et seule la mesure de l'ARN viral le permet; en effet la mesure du pouvoir infectant du plasma n'est qu'un reflet très incomplet de la concentration du virus circulant, compte tenu du fait que chez la quasi-totalité des sujets séropositifs asymptomatiques des anticorps sériques viennent neutraliser l'activité infectieuse du virus.

On a maintenant trouvé de façon inattendue que l'on peut y parvenir en mettant en oeuvre un moyen pour le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro comprenant des moyens pour la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquides et des moyens pour l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne (en abrégé "PCR") et comportant un moyen de quantification des résultats composé d'un étalon externe formé par des prélèvements de cultures de cellules infectées par des quantités déterminées dudit rétrovirus titrées en leur protéine virale de référence, lesdits prélèvements étant distribués dans du liquide normal dosé en parallèle avec le liquide à tester.

La mesure de l'ARN du virus nécessite quant à elle:

- la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral, en pratique grâce à l'enzyme appelée transcriptase réverse ou inverse, et
- l'amplification de l'ADN grâce à la PCR mentionnée plus haut.

La deuxième partie de la manipulation est actuellement bien connue et étalonnée comme il est indiqué plus haut.

En revanche, il n'existait jusqu'à présent pas de méthode permettant la standardisation de la première partie de la manipulation, c'est-à-dire le passage de l'ARN viral en ADN viral. Or, le rendement de la transcriptase réverse peut varier d'une manipulation à l'autre d'un facteur allant jusqu'à 2 log (soit un écart de 1 à 100).

L'invention apporte un progrès décisif aux moyens et aux méthodes de dosage quantitatif de rétrovirus in vitro en procurant un moyen et une technique simples et efficaces pour la standardisation de ce passage de l'ARN viral en ADN viral.

Comme on l'a indiqué ci-dessus, ce moyen comporte un moyen de quantification composé d'un standard externe approprié.

L'invention a donc pour premier objet un moyen pour le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro, comprenant des moyens pour la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquide et des moyens pour l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne, caractérisé en ce qu'il comporte un moyen de quantification des résultats composé d'un étalon externe formé par des concentrations virales titrées en leur protéine virale de référence , issues de cultures de cellules infectées par le rétrovirus concerné, lesdites concentrations virales étant distribuées dans un liquide indemne de ce virus et identique au liquide à tester.

L'invention a également pour objet un procédé pour le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro, comprenant la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquide et l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne, caractérisé en ce qu'il comporte, pour la quantification des résultats, la mise en oeuvre d'un étalon externe formé par des prélèvements de cultures de cellules infectées par des quantités déterminées dudit rétrovirus titrées en leur protéine virale de référence (ou "protéine de core"), lesdits prélèvements étant distribués dans du liquide indemne de ce virus, dosé en parallèle avec le liquide à tester.

La présente invention a en outre pour objet un kit de diagnostic quantitatif comprenant un tel moyen, ainsi que l'utilisation de celui-ci pour le diagnostic des maladies à rétrovirus, notamment les virus VIH, les autres lentivirus humains et animaux, les oncovirus humains et animaux et les spumavirus humains et animaux.

Ces objets, ainsi que d'autres qui apparaîtront mieux à la lumière de la description qui suit, seront illustrés plus concrètement en référence aux exemples

et aux figures annexées, auxquels il est utile de se référer, mais qui ne limitent en rien l'invention.

Les protéines de référence sont notamment la protéine de core P24/25 pour les virus VIH-1, la protéine P27 pour les virus VIH-2 et les virus SIV, et la protéine P19 pour les virus HTLV-1.

Quant au virus servant à constituer l'étalon externe selon l'invention, on peut en variante lui substituer tout autre rétrovirus ayant sensiblement les mêmes caractéristiques que lui en termes de protéine et d'ARN viral.

On entend par liquide, selon la présente invention, tous les liquides biologiques issus du monde animal ou végétal, comme par exemple le sérum, le plasma, le liquide intracellulaire, la sueur, l'urine, ainsi que l'eau des rivières et autres, mais également les liquides de laboratoire, tels que les surnageants de cultures et autres, et plus généralement toute autre forme de liquide aussi bien naturel qu'élaboré par l'homme.

Pour la mise en oeuvre des moyens selon l'invention, il convient de disposer de concentrations élevées de VIH obtenues par culture de cellules infectées par le VIH. Cela peut être obtenu par une méthode décrite par J.-M. Andrieu et W. Lu dans Journal of Virology, Jan. 1992, pages 334-340.

Sachant que dans les surnageants de cultures virales la concentration en protéine (en l'espèce la protéine P24) non liée au virus ou libre est non significative (inférieure à 1%), la concentration en protéine est proportionnelle au nombre de protéines virales. (cf. A.S. Bourinbaiar, Nature, vol. 349, 10.01.1991).

On a maintenant proposé selon la présente invention d'élaborer un standard externe composé de préférence de concentrations croissantes de virus titrées en P24. On utilise avantageusement pour ce faire des quantités de virus sensiblement équivalentes à 100, 10, 1 et 0,1 pg de P24 distribuées dans environ 0,5 ml de liquide normal qui est soumis aux mêmes manipulations que le liquide à tester.

On a pu observer par ce moyen qu'une concentration d'ARN obtenue par rétrotranscription, puis PCR (mesurée en coups par minute, en abrégé cpm) est parfaitement proportionnelle à la concentration de virus initialement présente (mesurée en P24).

On recommande donc désormais, selon la présente invention, d'utiliser le VIH dont la concentration est mesurée par l'étude de la concentration de la protéine P24 comme standard externe pour le dosage de la concentration d'ARN du virus présent dans le sérum des patients.

Pour s'assurer du caractère parfaitement reproductible de ce standard externe selon l'invention, on a réalisé plusieurs types de manipulations. Tout d'abord des virus provenant respectivement de personnes séropositives et de personnes ayant le SIDA issues de régions géographiques différentes ont été comparés et se sont avérés donner la même concentration d'ARN viral, à condition que les mêmes concentrations de protéines P24 aient été mises en oeuvre.

On a en effet pu démontrer que, quelle que soit l'origine individuelle ou géographique du virus (VIH-1), des concentrations similaires de protéine de core étaient associées à:

1) d'une part un pouvoir infectant semblable de lymphocytes humains (cf. J.-M. Andrieu et W. Lu, op. cité),

2) d'autre part des concentrations sensiblement identiques d'ARN viral.

Par ailleurs on a observé que l'ARN issu de virus inactivés à la chaleur (1 heure à 56°C environ) a exactement les mêmes propriétés que l'ARN issu du virus infectieux: les mêmes concentrations de virus mesurées en protéines P24 sont à l'origine des mêmes concentrations d'ARN viral.

A titre d'exemple concret de mise en oeuvre de ces moyens selon l'invention, on a procédé comme suit:

Un surnageant de culture de HIV-1 infectieux ou inactivé à la chaleur selon les cas, ayant un nombre connu de particules virales (déduit par mesure de la teneur en protéine P24 associée au virion) a été dilué sériellement dans du sérum AB humain (à 1000, 100, 10 et 1 pg/ml). Une fraction aliquote de 500 µl de chaque dilution de surnageant de culture virale ou 500 µl d'échantillons de sérum de patients ont été pastillés par centrifugation et extraits par la méthode RNAzol® B (Wak-Chemie Medical GmbH). Les échantillons d'ARN ont été remis en suspension dans 50 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate et contenant 1 mM de DTT (Sigma) et 5 U de RNAsin (Promega). Après traitement avec 2 U de DNase I exempte de RNase (Promega), on a soumis à une rétrotranscription deux parties aliquotes de 10 µl de chaque échantillon d'ARN, et on a amplifié pour un gène gag spécifique de HIV-1 avec un kit RNA PCR (Perkin Elmer Cetus) utilisant des primers (amorces) SK 104/SK 145. On a testé la spécificité de la PCR par amplification simultanée d'ADN de HIV cloné [BH-10 (HTLV-3-B)] et analyse de Southern-blot (transfert d'ADN) pour chaque expérience. On a effectué une PCR en parallèle en l'absence de transcriptase réverse e/ou de modèle de copie (template) comme témoins négatifs. Deux parties aliquotes de 10 µl de chacun des produits de PCR amplifiés ont été directement transférées sur une membrane en Nylon et testées avec un SK 19

marqué aux extrémités au gamma-^{32}P. On a quantifié le signal du produit de PCR en déterminant la valeur de radioactivité en cpm (coups par minute). La courbe standard (étalon) de particules virales d'ARN pour chaque lot d'expériences a été déterminée à partir de la moyenne et de l'écart-type d'une itération de quatre points de chacune des dilutions. On a procédé aux évaluations des échantillons de sérum des patients par une formule dérivée de la courbe standard. On a ainsi pu vérifier que les droites standards obtenues au cours de manipulations différentes restaient toujours parallèles aux droites standards témoins de la PCR d'ADN et servaient de témoins de sensibilité et de reproductibilité de la PCR.

Les résultats obtenus dans des expériences conduites conformément à cette description sont représentés sur les fig. 1 à 8 annexées.

Ces figures sont des graphiques où sont portés respectivement en abscisse le log du nombre de coups par minute (cpm) comptés au compteur Geiger comme quantification du signal du produit de PCR et en ordonnée le nombre de copies ARN/ADN.

La droite de référence du bas est le standard ADN (pour différentes concentrations de plasmide viral). La droite de référence résultant du standard externe selon l'invention est dans tous les cas pratiquement parallèle au standard ADN, et surtout son écart avec la courbe étalon est variable d'une manipulation à l'autre, ce qui confirme sans conteste la nécessité de l'étalon selon la présente invention. Cela est lié à une activité de transcriptase réverse similaire au sein d'une même manipulation, mais différente d'une manipulation à l'autre.

On vérifie ainsi que pour les dilutions de virus standards, le ratio de rétrotranscription est sensiblement constant au sein d'une même manipulation.

D'autres éléments relatifs aux résultats de ces essais comparatifs pour lesquels ont été mis en oeuvre les moyens selon l'invention se trouvent dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Ainsi la présente invention permet d'établir qu'un standard externe issu d'un pool de virus ou de souches virales équivalentes, de préférence inactivés par la chaleur ou tout moyen équivalent, provenant d'un grand nombre de patients infectés par le rétrovirus concerné, peut être utilisé par tout laboratoire qui souhaite mesurer la concentration du dit virus.

En pratique on recommande d'utiliser quatre concentrations, de préférence de virus inactivé, distribuées dans du liquide normal auquel on fait subir l'ensemble des manipulations de la même façon qu'au liquide testé, pour obtenir une droite de référence.

Il convient dans la pratique d'établir ce standard lors de chaque manipulation.

TABLEAU 1 - Quantification des particules virales (vp) de HIV-1 du sérum de patients par l' ARN(TR)-PCR en utilisant la souche virale avec un nombre connu de vp de HIV-1 comme standard externe.

Stades des patients selon CDC	cellules CD4 T circulantes/µl	Moyenne ± écart-type de vp/variation intra-test (log max-log min)	Moyenne ± écart-type de vp/variation inter-test (log max-log min)
		(1)	(2)
CDC II (asymptomatique)	934	469 ± 85 / (0,282)	481 ± 212 / (0,532)
CDC III (asymptomatique)	674	4021 ± 624 / (0,253)	3788 ± 1535 / (0,471)
CDC IVc (SK)	380	377946 ± 71459 / (0,279)	410673 ± 125556 / (0,538)
CDC IVb (IO)	34	1559378 ± 265742 / (0,322)	1368712 ± 436657 / (0,526)

(1): Les échantillons de sérum ont été testés cinq fois dans une expérience
(2): Les échantillons de sérum ont été testés sur cinq lots différents dans l'expérience

Dans le tableau 1 ci-dessus:
CDC = Centers of Disease Control (Atlanta, USA)
SK = Sarcome de Kaposi
IO = Infection opportuniste

Le tableau 1 montre la similitude de virus provenant de patients très différents et la variation intra-test et inter-tests.

TABLEAU 2 - Amplification par ARN(TR)-PCR de 100 pg de souches de HIV-1 infectieuses ou inactivées par la chaleur, isolées à partir de patients asymptomatiques ou ayant le SIDA.

Stades des patients selon CDC	cellules CD4 T circulantes/µl	Mesure quantitative d'amplification par transcriptase réverse, puis PCR	
		VIH infectieux (moyenne ± écart-type de cpm)	VIH inactivé à la chaleur (moyenne ± écart-type de cpm)
CDC II (asymptomatique)	934	15441 ± 2046	17646 ± 299
CDC III (asymptomatique)	674	15110 ± 2170	15511 ± 2108
CDC IVc (SK)	380	15756 ± 2867	10479 ± 1202
CDC IVb (IO)	34	17019 ± 2757	16988 ± 3007

* Cela correspond à 10^6 particules virales

** Les échantillons de sérum ont été testés cinq fois dans une expérience

REVENDICATIONS

1. Moyen pour le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro, comprenant des moyens pour la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquide et des moyens pour l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne (en abrégé "PCR"), caractérisé en ce qu'il comporte un moyen de quantification des résultats composé d'un étalon externe formé par des concentrations virales titrées en leur protéine virale de référence, issues de cultures de cellules infectées par le rétrovirus concerné, lesdites concentrations virales étant distribuées dans un liquide indemne de ce virus et identique au liquide à tester.

2. Moyen de dosage selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rétrovirus est choisi parmi les rétrovirus VIH-1, VIH-2, HTLV-1, HTLV-2 et SIV.

3. Moyen de dosage selon la revendication 1, caractérisé en ce que le liquide est un sérum animal ou humain.

4. Moyen de dosage selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rétrovirus est du virus VIH-1 ou VIH-2 et la protéine de référence est une protéine P24/25 ou P27.

5. Moyen de dosage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites quantités déterminées de rétrovirus sont des quantités équivalentes respectivement à 100, 10, 1 et 0,1 pg de protéine distribuées dans environ 0,5 ml de liquide indemne du virus concerné.

6. Kit de diagnostic pour le dosage des rétrovirus, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Procédé pour le dosage quantitatif de rétrovirus in vitro, comprenant la rétrotranscription en ADN viral de l'ARN viral de prélèvements de liquide et l'amplification de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne, caractérisé en ce qu'il comporte, pour la quantification des résultats, la mise en oeuvre d'un étalon externe formé par des prélèvements de cultures de cellules infectées par des quantités déterminées dudit rétrovirus, titrées en leur protéine virale de référence (ou "protéine de core"), lesdits prélèvements étant distribués dans du liquide indemne de ce virus, dosé en parallèle avec le liquide à tester.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le rétrovirus est choisi parmi les rétrovirus VIH-1, VIH-2, HTLV-1, HTLV-2 et SIV, d'origine animale ou humaine.

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites quantités déterminées de rétrovirus sont des quantités équivalentes respectivement à 100, 10, 1 et 0,1 pg de protéine de référence distribuées dans environ 0,5 ml de liquide normal.

10. Utilisation d'un moyen selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour le diagnostic des maladies à rétrovirus, notamment les virus VIH, les autres lentivirus humains et animaux, les oncovirus humains et animaux et les spumavirus humains et animaux.

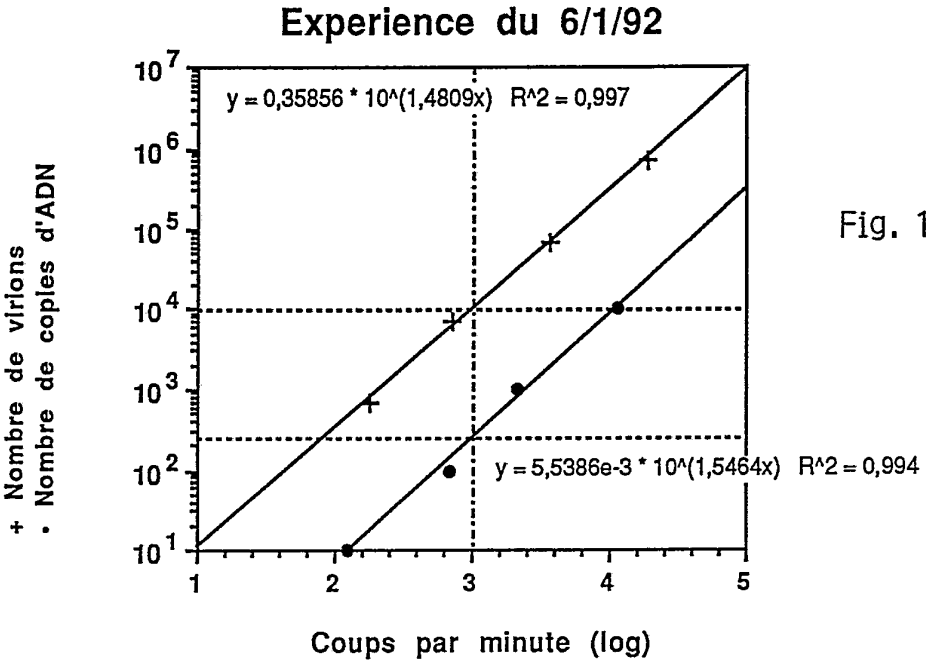

Experience du 6/1/92
y = 0,35856 * 10^(1,4809x) R^2 = 0,997
y = 5,5386e-3 * 10^(1,5464x) R^2 = 0,994
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 1

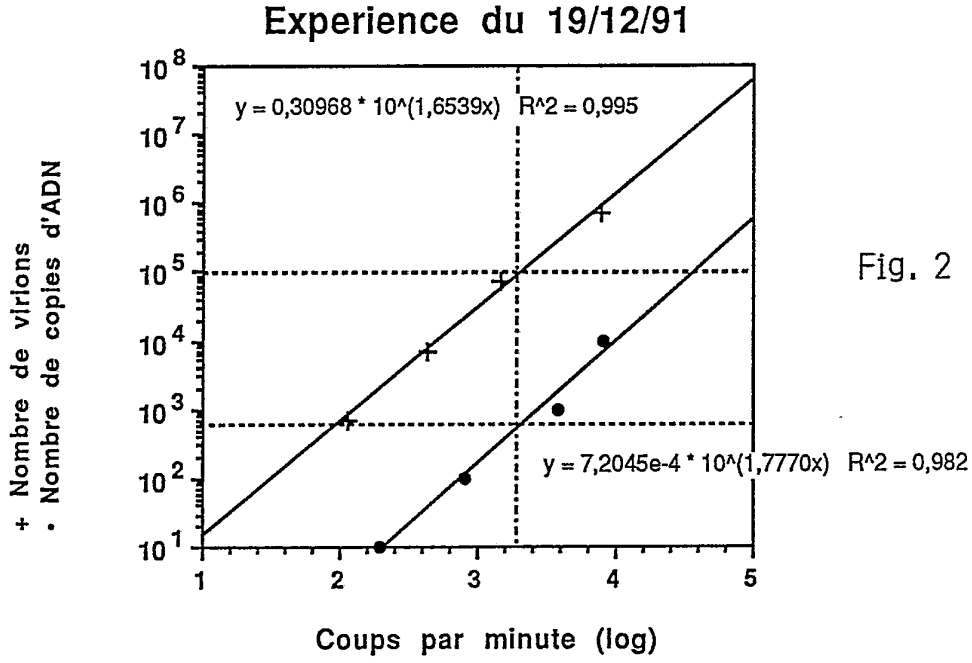

Experience du 19/12/91
y = 0,30968 * 10^(1,6539x) R^2 = 0,995
y = 7,2045e-4 * 10^(1,7770x) R^2 = 0,982
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 2

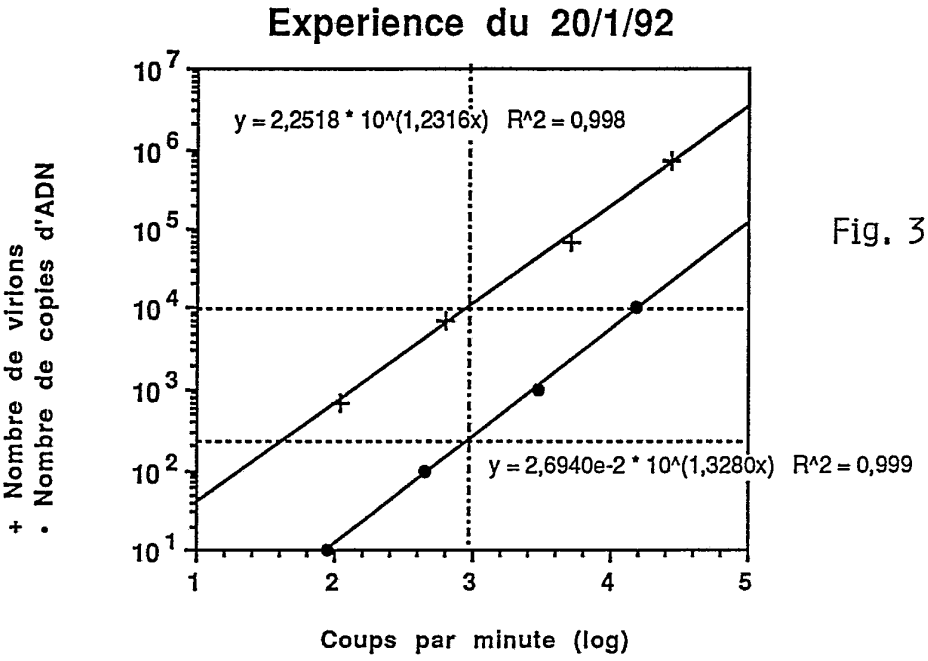

Experience du 20/1/92
y = 2,2518 * 10^(1,2316x) R^2 = 0,998
y = 2,6940e-2 * 10^(1,3280x) R^2 = 0,999
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 3

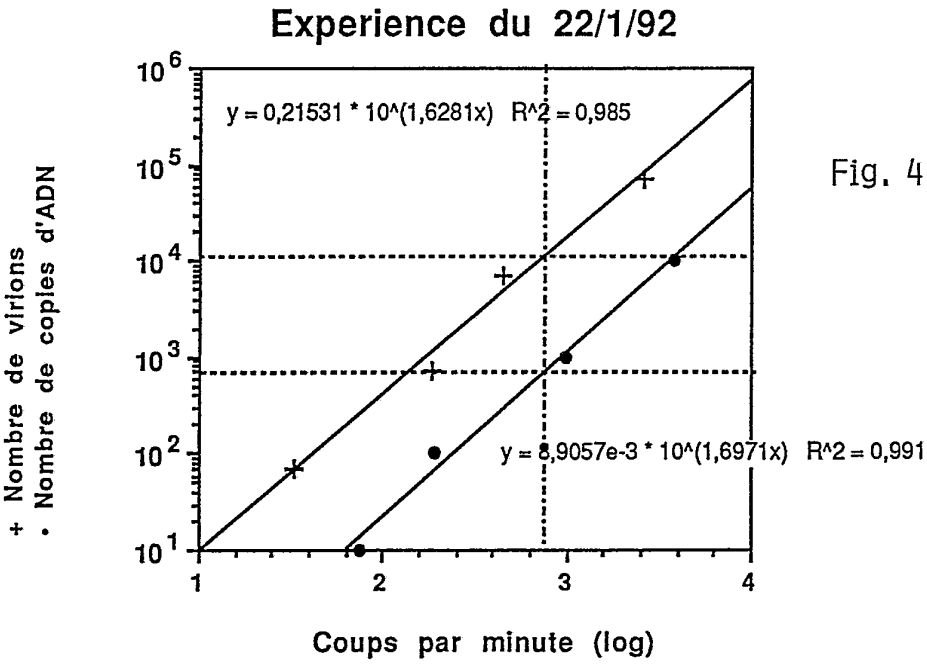

Experience du 22/1/92
y = 0,21531 * 10^(1,6281x) R^2 = 0,985
y = 8,9057e-3 * 10^(1,6971x) R^2 = 0,991
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 4

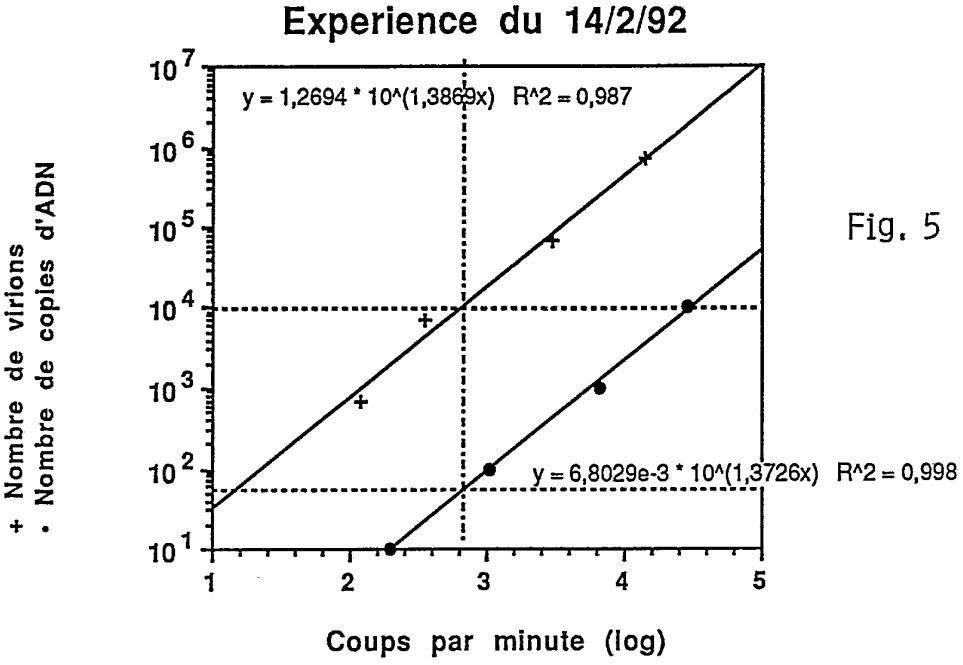

Experience du 14/2/92
y = 1,2694 * 10^(1,3869x) R^2 = 0,987
y = 6,8029e-3 * 10^(1,3726x) R^2 = 0,998
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 5

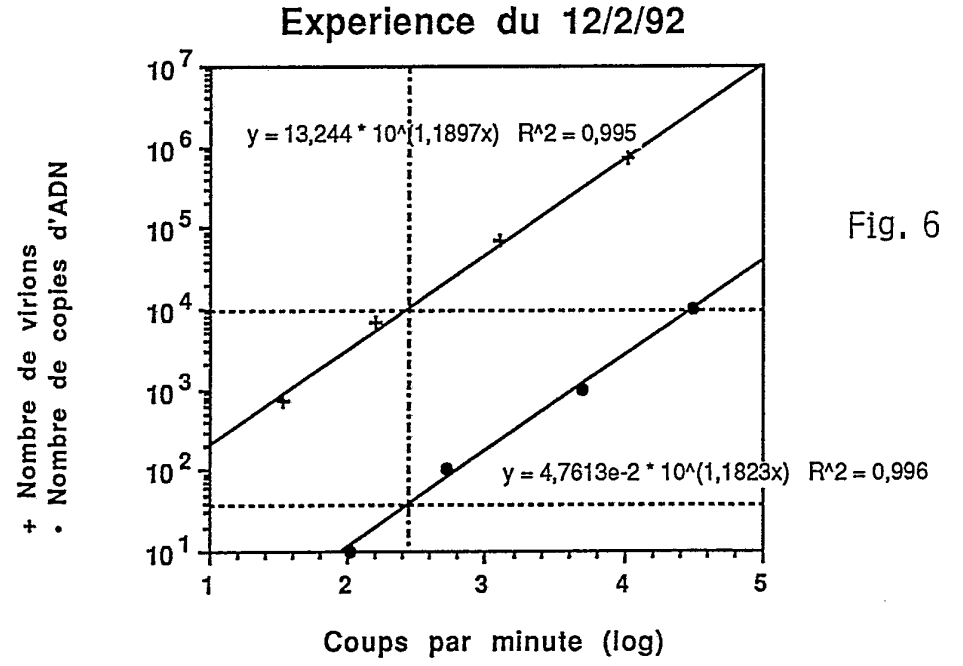

Experience du 12/2/92
y = 13,244 * 10^(1,1897x) R^2 = 0,995
y = 4,7613e-2 * 10^(1,1823x) R^2 = 0,996
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 6

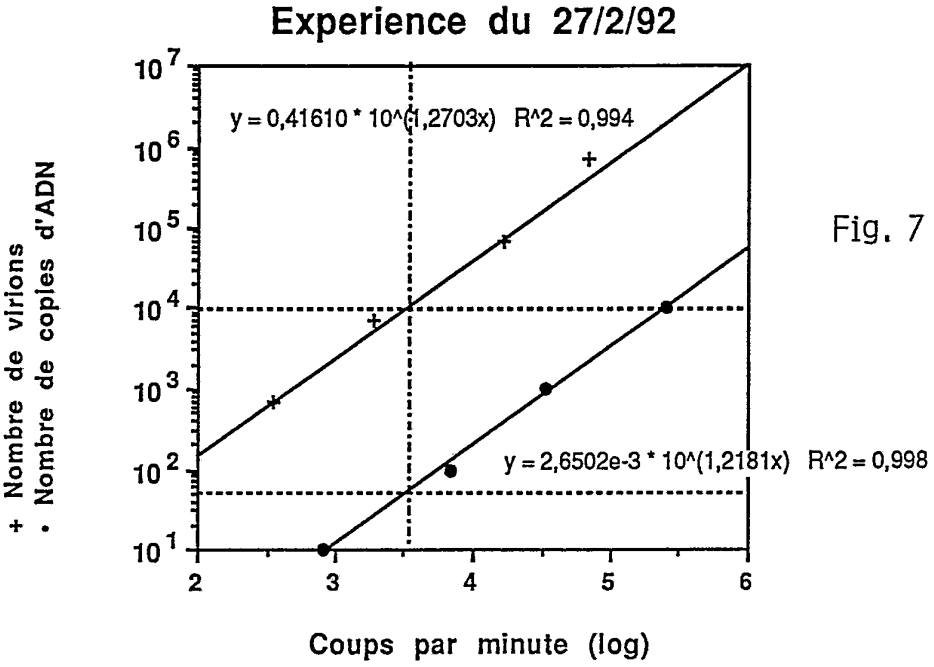

Experience du 27/2/92
y = 0,41610 * 10^(1,2703x) R^2 = 0,994
y = 2,6502e-3 * 10^(1,2181x) R^2 = 0,998
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 7

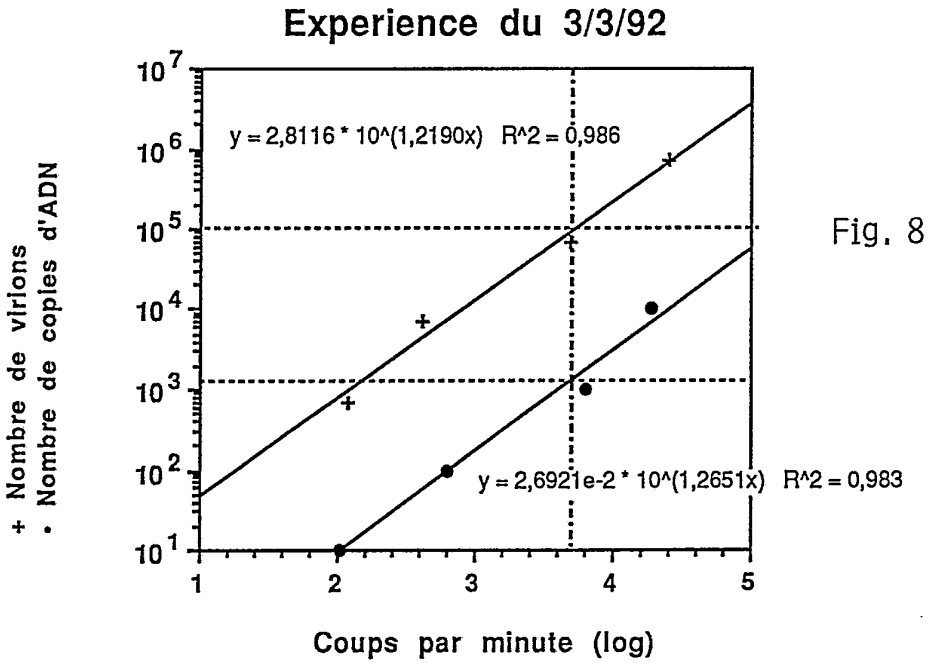

Experience du 3/3/92
y = 2,8116 * 10^(1,2190x) R^2 = 0,986
y = 2,6921e-2 * 10^(1,2651x) R^2 = 0,983
+ Nombre de virions
• Nombre de copies d'ADN
Coups par minute (log)

Fig. 8

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

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

2691162

N° d'enregistrement national

FR 9205718
FA 471803

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	PROC NATL ACAD SCI U S A 89 (8). 1992. 3241-3245. CODEN: PNASA6 ISSN: 0027-8424 ERON J J ET AL. 'SUSCEPTIBILITY TESTING BY POLYMERASE CHAIN REACTION DNA QUANTITATION A METHOD TO MEASURE DRUG RESISTANCE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES.' * le document en entier * ---	1-4	
A	WO-A-9 102 817 (CETUS CORP.) ---	-	
D,A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 66, no. 1, Janvier 1992, pages 334 - 340 W. LU ET AL ---	-	
D,A	JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES vol. 162, 1990, CHICAGO US pages 1025 - 1030 J. GENESCA ET AL. ---	-	
D,A	NATURE. vol. 349, 10 Janvier 1991, LONDON GB page 111 A. S. BOURINBAIAR 'HIV and gag' -----	-	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) C12Q

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
29 JANVIER 1993	MOLINA GALAN E.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

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

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

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

1