



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1010608A3

NUMERO DE DEPOT : 09600755

Classif. Internat. : C12Q

Date de délivrance le : 03 Novembre 1998

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 09 Septembre 1996 à 10H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : REMACLE José
Chemin des Pierres 14, B-5020 MALONNE(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Eric, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola 6/1 - B 1083 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE QUANTIFICATION D'UNE SEQUENCE D'ACIDES NUCLEIQUES.

INVENTEUR(S) : Remacle José, Chemin des Pierres 14, B-5020 Malonne (BE); Alexandre Isabelle, rue du Centre 3, B-5170 Lesve (BE); Zammattéo Nathalie, rue Pierre Fluche 1, B-4800 Verviers (BE); Ernest Isabelle, rue Hubert Larock 14, B-4280 Pouchet (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 03 Novembre 1998
PAR DELEGATION SPECIALE :

L. WUYTS
CONSEILLER

5

**PROCEDE DE QUANTIFICATION D'UNE SEQUENCE D'ACIDES
NUCLEIQUES**

10

Objet de l'invention

La présente invention concerne un procédé de quantification d'une séquence d'acides nucléiques cibles
15 présents dans un échantillon biologique, les séquences nucléotidiques standards utilisées dans ce procédé de quantification, le type de diagnostic comprenant lesdits standards et l'utilisation de ce type de diagnostic pour la quantification d'acides nucléiques cibles, tels que des
20 séquences d'ADN ou d'ARN de micro-organismes tels que des bactéries, des virus, des champignons, de plantes, d'animaux y compris l'homme présents dans un échantillon biologique.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

25 Les méthodes d'amplification génétique par PCR, LCR ou NASBA de séquences spécifiques d'acides nucléiques s'est révélée extrêmement riche en applications les plus diverses que ce soit dans le domaine du diagnostic médical, vétérinaire, dans l'agro-alimentaire et comme outil de
30 travail dans la recherche pour le dosage de gènes, leur clonage, la mise en évidence de mutations, la réalisation de mutagenèse, la construction et l'organisation de séquences

particulières d'acides nucléiques, etc.

Malgré ces très nombreuses applications potentielles, l'utilisation aux fins de diagnostic et de dosage d'acides nucléiques divers reste limitée par le problème de la quantification de la méthode. Pour arriver à obtenir la quantification de la séquence d'acides nucléiques présente dans l'échantillon biologique, il faut réaliser une quantification dans chacune des 3 étapes du dosage à savoir :

- 1) l'extraction quantitative (souvent complexe) de l'acide nucléique de l'échantillon biologique;
- 2) l'amplification quantitative de la séquence étudiée; et
- 3) la mesure quantitative du nombre de séquences amplifiées (appelées amplicons).

Les méthodes d'extraction varient d'un échantillon à l'autre en fonction de la difficulté de libérer l'acide nucléique des cellules, des protéines et molécules diverses auxquelles il est lié. L'utilisation de protéinase K est très répandue car elle permet la destruction des protéines des tissus et l'acide nucléique est souvent précipité par de l'éthanol. L'acide nucléique extrait peut aussi être purifié par adsorption sur des billes ou colonnes d'échangeuses d'ions en raison de la charge négative importante de l'acide nucléique. Très souvent cependant cette étape n'est pas nécessaire et l'acide nucléique extrait peut être utilisé tel quel pour l'étape d'amplification par PCR. Le facteur décisif qui détermine la méthode d'extraction à utiliser est la présence ou non d'inhibiteurs de la Tag polymérase utilisée pour l'amplification par PCR. De nombreuses firmes commercialisent des troussees complètes permettant l'extraction avec ou sans purification de l'acide nucléique.

Les méthodes d'extraction se sont améliorées ces dernières années et le rendement de ces extractions est très

souvent supérieur à 90 %, ce qui permet de considérer cette étape comme non limitante dans l'ensemble du processus de quantification de l'acide nucléique.

Par contre, l'étape d'amplification, notamment
5 l'amplification par la Polymerase Chain Reaction (PCR) telle que décrite dans le brevet US-4965188 pose encore de grosses difficultés pour ce qui est du contrôle de la quantification.

Dans l'amplification, la première étape consiste à désapparier les doubles brins d'ADN. Ceux-ci sont souvent
10 de très grandes longueurs et peuvent être stabilisés par des protéines ou molécules diverses. Il faudra donc monter la température suffisamment pour être certain que les deux brins sont séparés. Généralement, le premier cycle de dénaturation est plus long, de l'ordre de quelques minutes à 94°C. Pour
15 les cycles suivants, les amplicons ayant une taille réduite, un chauffage court à 92 ou 94°C suffira à les désapparier.

La deuxième étape est l'appariement (annealing) des oligonucléotides amorces. Ceux-ci sont en très large excès par rapport à l'ADN à amplifier et l'on peut trouver des
20 conditions dans lesquelles cette reconnaissance est optimale.

Ensuite vient l'élongation de l'ADN à partir des amorces par l'ADN polymérase. Celle-ci se fait si l'enzyme se trouve dans les conditions optimales pour son activité (pH, T°, sels, dNTP, ...) et il doit rencontrer les sites de
25 fixation Amorce-ADN. Même dans les conditions optimisées, on constate que le rendement (ou taux) d'amplification, c'est-à-dire la proportion moyenne des molécules qui se dupliquent au cours d'un cycle ne dépasse pas 90 % et peut être même très inférieure à cette valeur (J. Peccoud, 1993,
30 Med/sci, 2, 1379).

De plus de très grandes variabilités existent qui ne permettent pas d'obtenir des résultats reproductibles pour

l'amplification d'une séquence d'ADN donnée. C'est ainsi qu'on trouve une variabilité d'un échantillon à l'autre, d'un même échantillon en fonction de la dilution et même d'un tube à l'autre pour un même échantillon (J. Peccoud, 1993, Med/sci, 12, 1378-1385).

La méthode d'amplification par Ligase Chain Reaction (LCR) (Landegren et al., 1988, Science, 241, 1077-1080) et par NASBA présentent les mêmes difficultés de l'estimation du taux d'amplification et donc de la quantification des séquences cibles à mesurer.

La quantification de la PCR à déjà fait l'objet de plusieurs articles de revue (Clementi et al., 1993, PCR Methods and applications, 2, 191-196; Peccoud, 1993, Med/Sci., 12, 1378-1385; Ferre, 1992, PCR Methods and applications, 2, 1-9).

Il existe plusieurs moyens d'obtenir une quantification de la séquence nucléotidique cible. Comme l'amplification par PCR dépend de très nombreux facteurs et que des variations sont observées d'un test à l'autre, on doit utiliser comme références un standard qui soit le plus proche possible de la séquence cible et si possible qui est amplifié dans le même tube. Ces variations expliquent pourquoi l'utilisation d'un standard interne c'est-à-dire placé dans le même tube de PCR et amplifié en même temps que la séquence cible est préférée à la comparaison avec un standard externe qui serait amplifié parallèlement au test. L'utilisation d'un standard externe n'est possible que dans le cas où la méthodologie de la PCR est bien standardisée et que l'on a vérifié la très grande reproductibilité des tests.

Le standard interne peut être un gène de référence comme celui de la globine qui donne ainsi une indication du nombre de cellules qui étaient présentes dans le test par

rapport auquel le nombre de séquences cibles peut être rapporté. Cette stratégie souvent utilisée en recherche n'est pas adaptée au diagnostic, car on ne contrôle pas toujours la taille et donc le nombre de cellules de l'échantillon analysé et d'autre part le gène de référence possède une séquence différente, des amorces différentes et une taille différente de celle de la séquence cible, ce qui entraîne des efficacités d'amplification différentes et donc une quantification difficile.

10 L'utilisation d'un standard interne, ajouté à l'échantillon dont on connaît le nombre de copies et qui aurait la même efficacité d'amplification lors de la PCR est la méthode de choix pour une utilisation dans des tests de diagnostic. C'est celle qui est examinée ci-après. On se limite à la description des standards ayant les mêmes amorces que l'ADN cible et donc amplifiés de manière tout-à-fait compétitive par rapport à ceux-ci. Il existe cependant une contrainte qui est celle de la détection par la suite des 2 amplicons. En effet pour que l'efficacité de l'amplification soit la même, il faut que les 2 séquences soient les plus semblables possibles mais d'autre part, il faut pouvoir les différencier lors de leur mesure. D'autre part une autre difficulté est liée à l'évolution de l'efficacité de la PCR au cours des cycles. Si pendant toute une série de cycles, 25 l'efficacité est maintenue constante, on constate en fin d'amplification un ralentissement de cette efficacité qui finit par devenir nulle. On obtient un effet plateau pour lequel le nombre d'amplicons n'augmente plus avec les cycles. Ce ralentissement apparaît à des endroits différentes de la PCR en fonction du nombre de copies présentes au départ. Ceci 30 complique l'utilisation du standard interne car d'une part, celui-ci pourrait continuer à être amplifié lorsque le cible

est déjà arrivé au plateau et d'autre part si les différences de concentrations entre les 2 séquences est trop grande, l'une des 2 arrivera au plateau alors que l'autre ne sera pas encore en concentrations suffisantes pour être mesurée. Ces contraintes conduisent souvent les auteurs à se limiter à des concentrations en standard interne très proches de celles des séquences cibles et à travailler dans la zone d'amplification logarithmique de la PCR.

10 Etat de la technique

Plusieurs paramètres influencent l'efficacité d'une amplification génétique comme la PCR. L'un de ceux-ci est certainement la taille, la composition et la séquence des amorces. Afin d'obtenir un standard qui est compétitif de la séquence cible, il faut tout d'abord qu'il soit amplifié par les mêmes amorces.

Ci-dessous, on décrit les standards internes compétitifs ayant des amorces identiques à ceux de l'ADN cible.

20 L'efficacité de la polymérase dépend aussi de la composition et de la taille de la séquence à amplifier. Il faudra donc utiliser des standards internes de composition la plus proche possible de celle de la cible mais portant des différences qui leur permettent d'être distingués lors de la mesure de leurs concentrations respectives.

25 Très fréquemment, on utilise une mesure des amplicons après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans ce cas, la mesure des 2 amplicons (standard et cible) ne peut se faire que s'ils sont de tailles différentes, c'est-à-dire s'ils migrent à des vitesses différentes sur le gel et sont donc bien séparés. Cependant, on doit utiliser un standard interne le plus proche possible

de l'ADN cible afin d'obtenir un taux d'amplification semblable mais ayant une taille différente. La solution la plus élégante est d'utiliser comme standard interne une séquence correspondante à la séquence cible mais dans laquelle on a enlevé ou ajouté une portion de séquence. Ainsi, le standard aura des amorces identiques et une séquence identique à une partie de la séquence cible. La différence étant la taille de la séquence, on ne peut cependant garantir un taux d'amplification identique (Clementi et al., 1993, PCR methods and applications, 2, 191-196; Gilliland et al., 1990, Proc. Nat. Acad. Sci., 88, 2725-2729; Seibel et al., Methods Mol. Cell Biol., 2, 147-153; Diviacco et al., 1992, Gen., 122, 3013-3020; Menzo et al., 1992, J. Clin. Microbiol., 30, 1752-1757; Pratak et al., 1993, Science, 259, 1749-1754; Pratak et al., 1993, Biotechniques, 14, 70-79; Zachar et al., 1993, Nucleic. Ac. Res., 21, 2017-2018; Cross N., 1995, B. J. Haematology, 89, 693-697; Boivin et al., 1995, J. Virological Meth., 51, 329-342; Siebert and Larrick, 1992, Nature, 359, 557-558; Bouabouba et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 21830-21838, (WO 94/10342), (WO 94/10342) et (WO 94/20640)).

Dans la demande de brevet EP 0 525 882, on propose d'utiliser comme standard interne une séquence mutante qui va entrer en compétition avec la séquence à mesurer et étudier la diminution du signal. Une réduction de 50 % signifie la présence en quantité équivalente du standard et de la séquence à mesurer.

Dans la demande de brevet WO 93/23573, on propose aussi l'utilisation d'un standard interne RNA pour le dosage des ARN viraux avec séparation sur gel sur base de la longueur différente des 2 séquences.

Il est possible d'obtenir des standards de même

taille et de séquence très proche de l'ADN cible, lorsque l'on peut réaliser une ou plusieurs mutations qui font apparaître un site de restriction. Cette séquence est alors utilisée comme standard interne. Après amplification, les
5 amplicons sont digérés par une enzyme de restriction et les 2 fragments sont évidemment plus petits que l'ADN cible et donc ils peuvent être mesurés sur gel. Cette technique permet l'utilisation d'un standard très proche de l'ADN cible (WO 93/02215 et US: 5, 213, 961) et serait donc une méthode
10 idéale si elle ne nécessitait une étape de digestion qui n'est pas nécessairement quantitative et provoque la formation d'hétéroduplex entre les deux fragments qui vont fausser les mesures des concentrations des fragments jusqu'à un facteur 3 (Gilliland et al., 1990, in PCR protocols, Ed.
15 M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, pp. 60-69, Academic Press, New York; Becker-André M. and Hahlbrock K., 1989, Nucleic Acid Res., 17, 9437-9446; Ferre F., 1992, PCR Methods and Applications, 2, 191-196 (Revue) and Lun et al., 1991, Exp. Hematol., 19, 817-822; Stieger et
20 al., 1991, J. Virol. Methods, 34, 149-160).

Dans la demande de brevet US : 5, 219, 727 et US : 5, 476, 774, le standard interne est amplifié de manière compétitive par rapport à la séquence cible et après amplification sa concentration est comparée à une courbe de
25 standardisation pour déterminer la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon. Comme standard interne, on utilise un plasmide qui contient diverses séquences d'amorce correspondant à diverses amorces pour l'amplification de plusieurs gènes différents et dont la longueur ne correspond
30 pas à celle du gène à mesurer. La séparation des amplicons se fait par électrophorèse sur base de leur taille différente.

Une autre méthode consiste à utiliser dans une première PCR un standard semblable mais non identique à la séquence à amplifier et dans une seconde PCR des amorces différentes pour le standard et la séquence cible de manière à obtenir des fragments de longueurs différentes (WO 93/1025). Dans ce cas aussi la détection se fait sur base de longueurs différentes et une utilisation des amorces différentes dans la deuxième PCR.

Dans la demande de brevet WO 95/02067, on propose d'utiliser plusieurs séquences d'acides nucléiques différents et ceci en proportions différentes mais ayant les mêmes amorces que l'ADN cible à mesurer. Après amplification les divers amplicons sont mesurés et leur proportion relative comparée à celle de l'ADN cible à mesurer. L'utilisation de nombreuses séquences différentes entrant en compétition avec la séquence à mesurer complique fortement l'évolution de l'amplification de celle-ci surtout dans la partie non linéaire de l'amplification par PCR. De plus, il faut vérifier que l'efficacité de l'amplification est bien la même pour chacune de ces séquences et pour l'ADN cible, ce qui est difficile vu leurs compositions différentes.

Afin d'éviter l'inconvénient provoqué par l'utilisation des enzymes de restriction, mais en gardant des standards de taille identique à celle de l'ADN cible, on utilise des sondes nucléiques qui vont reconnaître des parties ou l'entièreté des séquences des amplicons. Ces sondes sont marquées soit avec un isotope radioactif, soit avec une molécule qui peut être détectée soit directement (par exemple en fluorescence ou chemoluminescence) soit après réaction avec un conjugué comprenant une enzyme qui permet une détection en colorimétrie, en chemoluminescence ou en bioluminescence. Parmi les molécules marquant les sondes, on

peut citer la biotine ou les haptènes comme la digoxigénine et parmi les enzymes de détection signalons la peroxydase, la phosphatase alcaline ou la pyruvate kinase. Ces enzymes peuvent être conjuguées soit à l'avidine (ou streptavidine) pour la fixation sur la biotine ou sur des anticorps dans le cas de la fixation sur des haptènes. Ces modes de détection d'ADN sont bien connus et ont fait l'objet de nombreuses publications et de brevets. Ces méthodes de mesure des amplicons vont de paire avec leur séparation ou immobilisation sur support solide afin de pouvoir les séparer des molécules contaminantes et réaliser une mesure spécifique des ADN cibles et des ADN standards. Les méthodes d'immobilisation et de détection imposent des contraintes mais peuvent aussi avoir des avantages pour l'utilisation des standards internes. En effet ceux-ci doivent être immobilisés et être détectés spécifiquement et avec la même efficacité que les ADN cibles sans quoi la comparaison des mesures ne correspondra pas à la proportion des amplicons obtenus après l'amplification.

Une solution proposée par Mulder et al. (1994, J. Clin. Microb., 32, 292-300) est d'utiliser un standard interne ayant les mêmes amorces que l'ADN cible, une longueur identique et une proportion des bases GC/AT identique. Ainsi l'efficacité de l'amplification sera très proche pour les 2 séquences vu l'identité des amorces et donc des conditions d'appariement de ces amorces sur les séquences et une grande ressemblance entre la composition des 2 séquences. Leur détection se fait en captant les amplicons sur des oligonucléotides spécifiques du standard ou des cibles. Ils utilisent des amorces biotinylées au départ qui se retrouvent sur les amplicons et qui permettent leur détection grâce à un conjugué streptavidine-peroxydase.

Dans ce procédé, la capture et l'identification des amplicons se fait de manière directe (en une étape) par des sondes capteurs immobilisées qui doivent différencier les standards et les cibles. Cette technique présente l'inconvénient de ne pouvoir donner qu'une analyse quantitative sommaire de l'ADN cible. En effet, si, dans ce procédé, l'efficacité de l'amplification de la séquence standard et de la séquence cible est pratiquement identique, la capture et l'identification se fait sur des sondes capteurs différentes ce qui va affecter l'efficacité d'identification et donc de quantification de l'ADN cible.

Une méthode très proche a été décrite par Berndt et al. (1995, *Analyt. Biochem.*, 225, 252-257) qui ont utilisé un standard différent de 3 bases de l'ADN cible.

Dans ce cas, comme la différence doit être faible entre les deux amplicons afin de conserver une même efficacité de la PCR, l'identification de leur capture et la discrimination (détection) entre les deux amplicons n'est pas bonne. Dans ce procédé, il y a donc une incompatibilité entre l'efficacité d'amplification et l'efficacité de capture-détection.

Une autre stratégie consiste à utiliser des amorces marquées ou ayant une fonction particulière. Ces amorces se retrouvent ainsi incorporées dans les amplicons et ce marquage des amorces va servir à leur immobilisation. Le système le plus simple est d'utiliser une amorce marquée à la biotine et de capter les amplicons ainsi marqués sur des boîtes recouvertes de streptavidine (Ravaggi et al., 1995, *J. Clin. Microb.*, 33, 265-269). Par la suite, des sondes spécifiques soit de la séquence cible soit de la séquence standard sont utilisées pour s'hybrider avec les amplicons captés et le double brin ainsi formé est révélé par des

anticorps reconnaissants le double brin d'ADN. La discrimination est ici très faible d'une part du fait que tous les amplicons et les amorces libres se fixent sur la boîte recouverte avec la streptavidine et d'autre part parce

5 que les anticorps reconnaissent tous les doubles brins,. Une variante consiste à désapparier les doubles brins immobilisés puis de venir marquer le brin restant avec une sonde spécifique (Whitby and Garson, 1995, J. Virological Methods, 51, 75-88). Lorsque les amorces portent une amine libre,

10 elles peuvent être immobilisées par une réaction chimique qui les lie à une fonction carboxylique d'un polymère puis révélées par la fixation d'une sonde biotinylée spécifique soit du cible, soit du standard (Kohsaka et al., 1993, Nucleic Ac. Res., 21, 3469-3472; WO 94/09156). Dans ce cas

15 aussi l'immobilisation est peu spécifique et a des rendements très faibles. De plus la vitesse de fixation sera différente entre les petites amorces et les longs amplicons, ce qui complique l'analyse des résultats.

Les demandes de brevets WO 92/01812 et WO 95/02068

20 proposent aussi d'utiliser des amorces qui peuvent servir à l'immobilisation. L'utilisation d'un agent de couplage attaché à l'amorce a comme inconvénient majeur de fixer toutes les amorces et amplicons de la solution et de se réaliser très souvent avec un faible rendement et en

25 utilisant des réactifs souvent instables.

Dans ces stratégies, on utilise des amorces communes qui servent à l'immobilisation mais cette capture est donc non spécifique et va se faire avec les amorces libres qui entreront ainsi en compétition avec les amplicons

30 pour cette immobilisation.

La détection des standards internes peut aussi être faite après contact avec une substance permettant une mesure

des amplicons au spectrophotomètre et leur séparation dans un gradient de température (WO 93/16194).

L'usage d'un gradient externe a aussi été proposé notamment pour le dosage d'ARN viraux en utilisant des
5 prélèvements de cultures infectées par des quantités déterminées du virus. Dans ce cas, les PCR sont réalisées en parallèle dans des tubes différents, ce qui introduit des variations dans les amplifications (WO 93/23565).

10 Buts de l'invention

La présente invention vise à fournir un procédé et une trousse de quantification d'une séquence d'acides nucléiques cibles qui ne présentent pas les inconvénients de l'état de la technique cités.

15 Un but particulier de la présente invention vise à fournir un procédé et une trousse qui permettent une quantification optimale de ladite séquence d'acides nucléiques cibles avec une très grande spécificité et une très grande sensibilité.

20 Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé et une trousse de quantification qui permettent la quantification directe de la séquence d'acides nucléiques cibles présents dans l'échantillon biologique ou après une éventuelle amplification génétique, notamment par
25 PCR.

Un autre but de la présente invention vise à obtenir un procédé et une trousse de quantification de ladite séquence d'acides nucléiques cibles qui permettent l'amplification d'une séquence standard quel que soit le
30 nombre de cycles d'amplification génétique.

Un autre but de la présente invention vise à obtenir un procédé et une trousse de quantification basée sur

l'utilisation d'un standard interne ou externe.

Un dernier but de la présente invention vise à obtenir un procédé et une trousse de quantification qui soient d'utilisation simple et peu couteuse et qui permettent l'utilisation en routine de la quantification d'acides nucléiques présents dans un échantillon biologique; lesdits acides nucléiques pouvant être de l'ADN ou de l'ARN, spécifiques de micro-organismes tels que des bactéries, des virus, ..., des plantes ou des animaux ou spécifiques de perturbations génétiques (cancer, maladies génétiques, ...) affectant des plantes ou des animaux y compris l'homme.

Eléments caractéristiques de l'invention

La présente invention concerne un procédé de quantification d'une séquence nucléotidique cible présente dans un échantillon biologique, une séquence nucléotidique standard, une trousse de quantification comprenant ladite séquence nucléotidique standard ainsi que leur application telle que décrite dans les revendications annexées.

Brève description des figures

La figure 1 représente un schéma illustrant la structure nucléotidique d'un standard compétitif type, comparé à celle d'un ADN cible à mesurer lors d'une amplification par PCR.

La figure 2 représente de manière schématique la capture et l'identification d'une séquence nucléotidique cible ou standard par reconnaissance "sandwich" en bioluminescence.

La figure 3 représente un schéma d'un standard compétitif (A) pour la mesure de l'ADN viral de CMV et sa comparaison avec l'ADN cible (B). La

numérotation correspond à la séquence nucléotidique "immediate early gene" (Demmler et al., 1988, J. Infectious Diseases, 158, 1177-1184).

5 La figure 4 représente un schéma d'un standard compétitif (A) pour la mesure de l'ARN du virus HIV et sa comparaison avec l'ARN cible (B). La numérotation correspond à la séquence nucléotidique du gène de la polymérase (POL)

10 (Ratner et al., 1987, AIDS Res., 3, 57-69).

La figure 5 est une description schématique du principe de la quantification d'un ADN cible par utilisation d'un standard compétitif selon l'invention et leur mesure respective par des

15 sondes spécifiques après capture sur une séquence commune immobilisée.

La figure 6 représente une courbe de la concentration en ADN cible de CMV et du standard correspondant par hybridation sandwich et mesuré en

20 bioluminescence.

La figure 7 représente une courbe de la concentration en ADN cible de CMV et du standard correspondant par hybridation sandwich et mesuré en spectrophotométrie.

25 La figure 8 représente une courbe de concentration en ADN cible de CMV et en standard correspondant après amplification par PCR et hybridation sandwich en utilisant une sonde trappeur commune et une sonde biotinylée spécifique de l'ADN cible ou

30 du standard.

La figure 9 représente les mesures de l'ADN cible de CMV et du standard interne après une amplification par

40 cycles de PCR lorsque 1000 copies de standard ont été ajoutées à des quantités croissantes d'ADN cibles et mesurées après PCR par hybridation sandwich comme défini à la figure 5.

La figure 10 représente une droite d'étalonnage d'un ADN cible de CMV par l'utilisation d'un standard interne selon l'invention. Mille copies de ce standard interne ont été ajoutées à un nombre variable de copies de CMV comme explicité à la figure 5.

La figure 11 représente la quantification d'un ADN cible de CMV en fonction du nombre de cycles de la PCR grâce à l'utilisation d'un standard compétitif selon l'invention. Un standard compétitif de la séquence de CMV tel que décrit à la figure 2 a été utilisé et ajouté en quantité constante à l'échantillon ayant subi 4 dilutions différentes.

La figure 12 représente une RT-PCR compétitive réalisée sur un ARN cible de HIV et un ARN standard, et une détection en bioluminescence après hybridation sandwich. Le graphique représente pour chaque RT-PCR la détection obtenue en utilisant une sonde spécifique du cible ou du standard. Les résultats montrent une compétition entre l'amplification du cible ajouté en quantité constante (10^8 copies) par rapport au standard ajouté en quantité décroissante allant de 10^{10} (1), 10^8 (2) à 10^6 (3) copies.

Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention

L'invention concerne la construction d'une ou de plusieurs séquences d'oligonucléotides (ADN ou ARN) ayant des spécificités particulières, telles que décrites ci-dessous, et leur utilisation comme standards pour la mesure de séquence(s) cible(s) d'ADN ou d'ARN par hybridation sandwich à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées.

La construction représentée à la figure 1 de cette séquence "standard" 1 a été conçue de manière à ce que, en cas d'une éventuelle amplification préalable, l'efficacité de l'amplification soit identique ou très proche de celle de la séquence cible 2 à quantifier et que les amplicons du standard et du cible puissent être quantifiés avec une efficacité égale ou très proche.

Le standard 1 selon l'invention est compatible avec une éventuelle amplification préalable et une détection quantitative d'une séquence d'ADN (ou ARN) dont une partie A de la séquence est identique à l'ADN cible et une partie B, au moins, la plus petite possible, est différente. Dans le cas d'une amplification par PCR, ces deux parties seront flanquées de deux séquences 3 identiques à celles de l'ADN ou l'ARN cible qui serviront de matrice pour la fixation d'oligonucléotides amorces 4. La longueur du standard sera identique ou très proche de celle de l'ADN ou l'ARN cible. L'on veillera aussi à introduire dans la partie spécifique B un contenu en base AT et GC proche ou identique à celle de l'ADN ou l'ARN cible. Un exemple de standard utilisé pour la quantification d'un fragment d'ADN du virus CMV est donné dans la figure 3, et un exemple de standard à ARN pour la quantification d'une séquence d'ARN du virus HIV est montré à la figure 4.

Un tel standard permet également une

utilisation comme standard externe ou comme standard interne pour l'amplification par PCR. En effet, leur similitude et identité partielle permet un taux d'amplification très proche ou identique à celui de l'ADN ou l'ARN cible. Ils possèdent des séquences matrice 3 pour les amorces 4 identiques, donc qui réaliseront leur fixation (annealing) dans les mêmes proportions. Leur longueur identique, leur identité de séquence sur une grande distance et la similitude de la partie non commune en longueur et en rapport GC/AT fait que la lecture par l'ADN polymérase se réalisera avec la même efficacité. Dans le cas d'une utilisation comme standard interne, il possède également une propriété particulière. En effet, pendant la PCR, le ralentissement et l'arrêt de l'amplification de la séquence standard entraîne le même ralentissement pour la séquence cible et réciproquement. Ce ralentissement de l'efficacité à la fin de la PCR peut être due à plusieurs raisons : la diminution du nombre d'amorces, du nombre de nucléotides libres, la baisse d'activité de la DNA polymérase ou la rehybridation trop rapide des amplicons entre eux plutôt qu'avec les amorces lors de l'étape de fixation des amorces (annealing). Toutes ces raisons sont équivalentes pour les 2 séquences et auront donc la même influence sur leur amplification. Cette dernière propriété est particulièrement intéressante à souligner car lorsque un des deux amplicons (par exemple le standard) sera en forte concentration, il se réassociera en double brin de préférence à la fixation sur les amorces plus petites et donc moins stables. Cependant, comme il possède une grande séquence commune avec l'autre amplicon (par exemple le cible), il reformera aussi des réassociations stables (hybrides) avec cet autre amplicon, ce qui inhibera de la même manière la fixation des amorces. Ainsi le design des standards

compétitifs selon l'invention, permet une quantification indépendamment des cycles de la PCR. Un exemple est donné à la figure 11 montrant la possibilité de quantification après 25, 30, 35 et 40 cycles, moment où l'amplification de la PCR n'est plus exponentielle.

Conjointement à leur utilisation pour l'amplification, la présence sur ces standards d'une partie commune A et d'une partie spécifique B permet avantageusement leur mesure suivant la méthode appelée "hybridation sandwich" sur support insoluble avec une spécificité identique ou très proche de celle de l'acide nucléique cible (voir figure 2). Cette hybridation se réalise sur une surface insoluble (tubes, filtres, billes, microplaques, ...) sur laquelle une séquence nucléotidique 5 complémentaire de la séquence commune A de l'acide nucléique standard 1 et cible 2 est fixée. Cette séquence va servir de "trappeur" commun pour les 2 séquences à identifier. De cette manière toutes les molécules, amorces ou séquences d'ADN contaminants seront éliminés lors de cette fixation qui est spécifique uniquement des séquences à identifier.

Avantageusement, la détection que l'on favorise consiste à utiliser une deuxième séquence nucléotidique marquée 6 qui viendra se fixer sur la séquence spécifique B des oligonucléotides 1 et 2 fixés sur la séquence trappeur 5. Il s'agit d'une hybridation sandwich dans laquelle les amplicons 1 et 2 sont hybridés d'un côté par une sonde immobilisée 5 et de l'autre par une sonde marquée 6 (Zammatteo et al., J. Virol. Methods, 1995, 55, 185-197; WO 94/06933). Ce marquage 7 est habituellement constitué par de la biotine ou des haptènes ou des molécules chimiques diverses, fluorescentes, chemoluminescentes, colorées, radioactives, ... L'utilisation de cette méthode de détection

possède les avantages suivants : l'acide nucléique "trappeur" 5 est choisi de manière à reconnaître la partie identique A des deux oligonucléotides (cible 2 et standard 1). La partie différente B est reconnue spécifiquement par deux séquences 6 différentes. La reconnaissance se fait dans les 2 cas par des appariements de chaînes d'acides nucléiques qui permettent une très grande spécificité de reconnaissance. Cette méthode permet un dosage quantitatif des standards par rapport aux séquences d'ADN ou ARN présentes dans la 10 préparation. Habituellement, comme les séquences d'ADN ou d'ARN cibles à quantifier sont en quantité faible, avantageusement elles sont préalablement amplifiées (par exemple par la technique PCR) de manière à obtenir un très grand nombre de copies appelées amplicons. Cependant dans 15 certains cas, un dosage direct peut être effectué, c'est le cas notamment des ARN16S ou 23S, des ribosomes qui sont présents en plusieurs milliers d'exemplaires dans chaque cellule d'eucaryotes et de procaryotes et pour lesquels une mesure directe par hybridation sandwich et donc utilisation 20 de standards selon l'invention est possible. Pour la suite de la description, on décrit le cas le plus fréquent pour lequel une amplification préalable par la PCR a produit des amplicons qu'il faudra mesurer. De manière inattendue, l'utilisation des standards selon l'invention permet un 25 dosage quantitatif optimal des amplicons du standard et du cible. Les inventeurs ont observé que par l'hybridation sandwich, le facteur limitant est la fixation des amplicons 1 et 2 sur la séquence trappeur 5 immobilisé. Celle-ci étant présente sur une surface, la vitesse de réaction est beaucoup 30 plus lente du fait de la diffusion plus lente des réactifs à l'approche d'une surface rigide et aux encombrements stériques. Expérimentalement, on observe que l'on fixe moins

de 50 % des amplicons 1 et 2 sur les séquences trappeur 5. Cependant, même si ce pourcentage de fixation est faible, on observe qu'il est le même pour le standard 1 et pour le cible 2. Cette propriété s'explique par le fait que les 2 séquences
5 ont la même taille et qu'elles se fixent sur une séquence trappeur 5 de même type. La fixation des séquences spécifiques 6 marquées ne semble pas poser de problème, car il s'agit d'une sonde simple brin, mise en excès de manière à obtenir une fixation quantitative. Expérimentalement, on
10 peut obtenir 90 % de fixation de ces séquences 6 marquées sur les amplicons 1 et 2 trappés dans les puits. De plus, la longueur identique de ces séquences 6 et leur contenu plus ou moins comparable en GC et la concentration identique utilisée font que les 2 séquences spécifiques 6
15 complémentaires du standard 1 et du cible 2 se fixent avec la même efficacité. Ainsi l'ensemble de l'hybridation sandwich se réalise avec la même efficacité pour les amplicons standards 1 et pour les cibles 2. Ceci est illustré expérimentalement aux figures 6 et 7 qui utilisent deux
20 systèmes de révélation différents, l'un basé sur la bioluminescence et l'autre en spectrophotométrie.

On peut donc avantageusement utiliser ces standards comme standards externes puisque leur efficacité d'amplification sera identique et leur mesure par hybridation sandwich également. Une expérience de ce type est montrée à
25 la figure 8 dans laquelle des nombres de copies croissantes en CMV cible et standard ont été amplifiés par 40 cycles de PCR puis détectés par hybridation sandwich. On constate une évolution parallèle des deux courbes. On doit cependant
30 souligner une certaine variabilité des résultats provenant essentiellement des variabilités de l'amplification d'un même échantillon au cours de la PCR comme explicité ci-dessus.

Dans le cas où le standard est utilisé comme standard interne (c'est-à-dire que après l'amplification par PCR, les tubes contiennent un mélange d'amplicons de standard et de cible) cette hybridation sandwich permet aussi une quantification de ces deux amplicons avec la même efficacité en opérant de la manière suivante : la préparation contenant les 2 amplicons est diluée de manière adéquate et est ajoutée à 2 ou une double série de puits (ou filtres ou tubes) dans lesquels se trouve un ADN trappeur correspondant à tout ou une partie de la séquence commune des 2 amplicons. Dans un (ou une série de) puits, on ajoute une séquence marquée spécifique du cible et dans l'autre (ou 2ème série de) puits, on ajoute la séquence marquée spécifique du standard.

Pour une dilution donnée, la fixation des deux amplicons sur l'ADN trappeur sera identique dans les 2 tubes puisqu'ils seront présents à la même concentration. De plus comme le trappeur est commun aux deux amplicons et qu'ils ont une taille identique, leur fixation se réalisera avec le même rendement, c'est-à-dire que la proportion des 2 amplicons fixés sera identique à celle présente dans la préparation après PCR. Leur concentration relative aux fonds des puits ne dépendra donc que de leur concentration respective dans l'échantillon. Si l'on ajoute les séquences spécifiques marquées en excès de telle manière que leur fixation sur les amplicons soit quantitative, on obtiendra un marquage qui sera directement proportionnel à la concentration des amplicons dans la préparation.

On peut réaliser l'hybridation sandwich soit en deux étapes ou en une étape, en réalisant la fixation sur la séquence trappeur puis en ajoutant la séquence marquée spécifique ou en ajoutant ensemble la séquence marquée spécifique aux amplicons lors de l'immobilisation sur les

séquences trappeurs. Une variante à cette méthode consiste à utiliser comme séquence commune, une séquence marquée par un ligand spécifique qui peut s'hybrider avec les 2 amplicons en solution puis permettre la capture sur une surface sur laquelle se trouve le récepteur à ce ligand. Dans ce cas, on conserve les séquences spécifiques qui permettent la différenciation entre les 2 amplicons. L'avantage de cette manière de procéder est de réaliser les hybridations des séquences communes et spécifiques en solution, ce qui augmente la vitesse et le rendement de l'hybridation.

L'utilisation de standards selon l'invention permet donc d'obtenir non seulement une amplification identique (ou très proche) du standard et de l'ADN cible mais également leur capture et leur détection en proportion identique dans les tubes servant à la mesure des amplicons cibles et des standards. La mesure des séquences marquées doit se faire par la suite de manière quantitative de manière à garder la quantification à toutes les étapes. Un schéma reprenant les diverses étapes de la démarche de quantification à l'aide de standards internes est présenté à la figure 5.

A côté des propriétés particulières résultant du design du standard interne lors de l'amplification par PCR citées ci-dessus, à savoir une efficacité identique à celle de la cible de l'échantillon biologique ou une indépendance par rapport aux nombres de cycles de PCR, la quantification par hybridation sandwich telle que proposée dans ce brevet et réalisée suivant un protocole représenté à la figure 5 qui apporte encore un avantage que l'on peut observer dans l'exemple 5 (dont les résultats sont présentés dans les figures 9 et 10). Dans cette expérience, une quantité constante de standard interne soit mille copies ont été

ajoutés à des quantités croissantes de cibles CMV allant de 30 à un million de copies. Après 40 cycles d'amplification par PCR, les 2 séquences ont été mesurées après hybridation sandwich par mesure en spectrophotométrie. La figure 9

5 représente les données pour les standards et les cibles. On observe aux faibles concentrations en cible une présence importante du standard qui diminue au fur et à mesure que la quantité de cibles devient importante. Lorsque la quantité de cibles est égale à celle du standard soit mille copies,

10 les deux valeurs sont pratiquement identiques. Puisque l'une des propriétés de l'invention est de pouvoir garder les rapports constants entre le standard et la cible à chacune des étapes de la quantification, les rapports des signaux obtenus pour la mesure de la séquence nucléotidique cible et

15 standard ont été portés en fonction de la quantité de séquences cibles mise au départ. On obtient effectivement une relation linéaire, ce qui confirme bien la pertinence des résultats l'invention. Une propriété inattendue fut d'observer cette linéarité sur une échelle aussi importante

20 de séquences nucléotidiques cibles. En effet, les résultats indiquent la possibilité de détecter quantitativement entre 30 et un million de copies de ces séquences cibles en utilisant au départ mille copies de séquences standards. Cette propriété constitue un avantage pratique important car

25 les échantillons biologiques peuvent contenir des quantités très variables de séquences nucléotidiques cibles à mesurer et dans ce cas, un dosage linéaire de plus de 4 ordres de grandeur permet de diminuer fortement, sinon totalement, le nombre de dilutions à réaliser pour se situer dans la zone

30 de quantification.

La même démarche peut être réalisée lors de la mesure d'ARN par exemple des ARN messagers ou des ARN viraux.

Dans ce cas, il faut utiliser un standard qui est constitué d'une chaîne d'ARN ayant les mêmes spécificités que le standard ADN explicité ci-dessus. La démarche de l'amplification et de la mesure requiert une étape préalable
5 qui est la transformation de l'ARN en chaîne d'ADN par une enzyme ayant une activité de transcriptase inverse. La suite des opérations et la quantification est identique à celle explicitée ci-dessus. Un exemple de standard utilisé pour la quantification de l'ARN du virus HIV est donné en exemple à
10 la figure 4.

L'emploi de ces standards permet donc la quantification d'une séquence d'ADN (ou ARN) cible dans un échantillon et convient donc très bien à des tests de diagnostic ou de mesures d'ADN ou d'ARN en recherche ou dans
15 des tests de routine. L'utilisation d'oligonucléotides comme standards externes est moins intéressante que leur utilisation comme standards internes et elle exige des contrôles et des conditions particulières. Il faut être certain que l'efficacité de l'amplification est identique
20 pour l'échantillon et pour le tube contenant le standard externe; il faut aussi travailler dans la zone linéaire d'amplification afin de garder une proportionnalité entre le nombre d'amplicons obtenus et la quantité de séquences présentes dans l'échantillon et le standard au départ. Il
25 faudra également réaliser les tests en plusieurs exemplaires afin de minimiser les variations observées de tubes à tubes lors de l'amplification. Par contre on conserve les avantages donnés par la composition particulière de ce standard très semblable à la séquence d'acide nucléique cible pour obtenir
30 une amplification et une détection identique ou très proche de celle de l'acide nucléique cible, ce qui permet la quantification de cette dernière.

En pratique, l'échantillon contenant l'ADN ou l'ARN cible est traité parallèlement à des tubes contenant des concentrations croissantes de standard externe. Toutes les conditions d'amplification et de détection sont identiques et faites avec les mêmes solutions afin de minimiser les variations de traitement. Les résultats sont comparés à la courbe d'étalonnage obtenue avec les standards. Dans l'invention, on privilégie une série de dilutions de l'échantillon cible afin d'obtenir des valeurs correspondant à la zone couverte par les standards.

L'utilisation des standards internes permet non seulement de tenir compte de variations qui se produisent de tube à tube lors de la PCR, mais aussi de possibles inhibitions de la PCR qui peuvent se produire dans des échantillons biologiques. Celles-ci sont en général dues à une inhibition de l'activité de la polymérase par des contaminants présents dans la préparation. Dans le cas d'inhibition de l'amplification, celle-ci se produira sur les 2 séquences, cible et standard, présentes dans le même tube et la proportion des amplicons sera donc conservée malgré un rendement d'amplification plus faible. De plus cette inhibition de la PCR pourra être constatée et évaluée en comparant la mesure des amplicons du standard ajouté dans l'échantillon et celui utilisé comme contrôle positif de la PCR. En cas d'inhibition, le signal du standard interne présent dans l'échantillon fortement dilué sera inférieur à celui du contrôle contenant le même nombre de copies du standard interne traité dans les conditions optimales de PCR.

En pratique on ajoute à l'échantillon contenant l'ADN ou l'ARN cible, une quantité connue de standard puis l'on traite la préparation pour l'amplification et la détection après hybridation sandwich. Un contrôle positif

contenant le standard seul et un contrôle négatif sans ADN spécifique sont aussi réalisés pour chaque expérience. Le rapport du signal obtenu pour la mesure des amplicons cibles et pour les amplicons du standard est rapporté à une droite d'étalonnage (cfr. fig. 9) qui permet de déterminer le nombre
5 de copies d'ADN cible au départ.

Une méthode plus adéquate mais qui requiert plus de tests, consiste à diluer l'échantillon (par exemple 4 dilutions de 10 en 10) et d'y ajouter une quantité
10 constante de standard interne. Pour certains échantillons biologiques, il est nécessaire d'extraire et même parfois de purifier les acides nucléiques avant l'amplification pour éviter une inactivation de la polymérase. Dans d'autres, le chauffage à 100° destiné à séparer les doubles brins d'ADN
15 suffit. Le standard interne est normalement ajouté dans l'échantillon de départ. Il peut éventuellement, pour des raisons pratiques être ajouté après extraction si celle-ci est quantitative. C'est le cas où les acides nucléiques sont extraits d'un échantillon puis que l'on réalise 4 dilutions
20 avant d'ajouter une quantité constante de standards internes avant de faire la quantification comme dans l'exemple 6 et la figure 11. Cette manière de procéder ne nécessite qu'une seule extraction de l'échantillon. Après amplification et détection après hybridation sandwich, les rapports entre les
25 signaux des amplicons cibles et standards sont portés en fonction de la dilution du cible. Ces 4 points déterminent une droite qui permet de déterminer la valeur du rapport égale à 1 pour lequel, la quantité de cible équivaut à celle du standard. Cette manière de réaliser la quantification est
30 optimale. Un exemple est explicité ci-dessous et présenté à la figure 11.

Exemples**Exemple 1 Mesure de la quantité d'ADN cible et de standard par hybridation sandwich et mesurés en bioluminescence**

5 L'ADN cible à mesurer consiste en un oligonucléotide double brin de 314 paires de bases correspondant à la séquence numérotée 3191-3504 (Dember et al.) appartenant au quatrième exon du gène de réponse rapide (immediate early gene) de l'ADN du cytomégalo virus.

10 Le standard interne consiste en un oligonucléotide double brin de 314 paires de bases dont la séquence en nucléotides est identique à celle de l'ADN cible à mesurer excepté pour les 40 nucléotides allant de 3217 à 3256 qui constituent une séquence aléatoire mais dont le
15 pourcentage en GC est similaire à celui de l'ADN cible.

 La composition de ces nucléotides est présentée à la figure 3. Ces nucléotides sont d'abord chauffés à 100°C pendant 10 min puis incubés en concentration croissante dans des puits auxquels ont été fixés des sondes capteurs
20 correspondant à une partie de la séquence commune et fournis par Lambdatech (Namur-Belgium). La solution d'hybridation de 0,06 ml par puit contient une solution SSC 2 fois concentrée, du Denhardt 5 fois concentré, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 50 ng de sonde biotinylée de 40
25 nucléotides simple brin correspondant soit à la séquence complémentaire de l'ADN cible, soit à celle de l'ADN standard présentée à la figure 3. A ces 60 µl on ajoute 40 µl d'ADN cible au standard. L'hybridation se déroule à 70°C pendant 2 heures.

30 Après hybridation, les puits sont lavés 1 fois avec 0,2 ml de solution SSC 0,1 fois, puis une fois avec 0,2 ml de tampon maléate pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl et du Tween

0,3 % et enfin avec du tampon Maléate pH 7,5 NaCl 0,15 M et contenant 1 % de poudre de lait.

Un conjugué streptavidine-kinase est ajouté dans 0,1 ml à une dilution 1/1000 comme recommandé par le fournisseur (Lambdatech - Namur-Belgium) puis lavés 3 fois
5 avec 0,2 ml de tampon Maléate 0,1 M pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl et 0,3 % de Tween puis 1 fois avec une solution de glycine 500 mM pH 7,7 contenant du KCl 100 mM et MgCl₂ 1M.

L'activité de la kinase est obtenue en incubant
10 dans 0,1 ml de tampon TRIS-HCl 20 mM pH 7,75 contenant du DTT 0,06 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 5 mM, la luciférine 0,008 mM, luciférase 6 mU, KCl 20 mM, Phosphoenol pyruvate 1 mM et ADP 0,0032 mM. La lumière émise est enregistrée toutes les minutes et ces mesures sont intégrées pendant 1 heure. Les
15 mesures de la lumière sont enregistrées sur un appareil bioluminomètre (Luminoskan, Techgen) et indiquées en unités de lumière relative (RLU). Les valeurs expérimentales sont données pour les ADN cibles et les ADN standard à la figure 6.

20 **Exemple 2 Mesure de la quantité d'ADN cible et de standard par hybridation sandwich et mesurés en spectrophotométrie**

L'expérience est réalisée sur les mêmes ADN cible et standard correspondant à une séquence d'ADN du virus
25 du CMV et hybridés en sandwich en utilisant des sondes biotinylées spécifiques de l'ADN cible ou du standard comme explicité à l'exemple 1.

Après hybridation, les puits sont lavés 1 fois avec 0,2 ml de solution SSC 0,1 fois, puis une fois avec 0,2
30 ml de tampon maléate pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl et du Tween 0,3 % et enfin avec du tampon Maléate pH 7,5 NaCl 0,15 M et contenant 1 % de poudre de lait. Puis 0,1 ml de conjugués

streptavidine-peroxydase dilué 1/1000 comme conseillé par la firme Medgenics (Fleurus-Belgium) sont ajoutés à chaque puits et incubés 45 min à 20°C. Les puits sont lavés par 0,2 ml de tampon Maléate pH 7,5 contenant du NaCl 0,15 M et du Tween 0,3 % puis une fois avec 0,2 ml de tampon Glycine 500 mM pH 7,7 contenant 100 mM de KCl et 1M de MgCl₂.

L'activité de la peroxydase est mesurée par l'oxydation du TMB en présence d'H₂O₂ dans un 1,1 ml de tampon acetate-citrate 0,2 M pH 7,5.

Après 10 min de réaction, 0,22 ml d'une solution de H₂SO₄ 1,2 M est ajouté à chaque puits et la densité optique est mesurée à 450 mμ. Les résultats de l'exemple sont présentés à la figure 7.

Exemple 3 Mesure de la quantité d'ADN cible et de standard par hybridation sandwich et mesurés en chemiluminescence

L'expérience est réalisée sur les mêmes ADN cible et standard correspondant à une séquence d'ADN du virus de CMV et hybridés en sandwich en utilisant des sondes marquées à la digoxigénine dans les mêmes conditions que l'exemple 1. Après lavage, un conjugué anti-digoxigénine-phosphatase alcaline est ajouté à une dilution recommandée par le fournisseur (Boehringer, Mannheim-Allemagne) et incubé 45 min à 20°C. Les puits sont alors lavés 5 fois puis rincés avec 0,1 ml de tampon TRIS 0,1 M pH 9,5 contenant NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM, puis l'on ajoute 0,1 ml de AMPPD (substrat de la phosphatase) dans le même tampon. La lumière émise est lue toutes les minutes dans un luminomètre et les lectures intégrées pendant 10 min.

On obtient une courbe de concentration semblable à celle obtenue dans l'exemple 1.

Exemple 4 **Mesure de la quantité d'ADN cible de CMV par utilisation d'un standard externe par hybridation sandwich après amplification par PCR**

5 De l'ADN du virus de CMV contenu dans un plasmide dont on connaissait le nombre de copies a été placé en concentrations croissantes dans les tubes pour la PCR. Parallèlement, on prépare des tubes contenant des concentrations croissantes de standard externe tel que défini
10 à la figure 3. Tous les tubes ont subi une PCR de 40 cycles en utilisant des amorces correspondant à la séquence 3191-3217 et 3504-3481 du gène de CMV (figure 3). La PCR démarre par 1 passage 3 min à 94°C et se poursuit avec 40 cycles définis comme suit :

15 Chaque cycle de PCR comprenait une température de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une période d'appariement des amorces à 65°C pendant 30 sec et une polymérisation de 30 sec à 72°C. La solution de PCR de 0,1 ml comprenait 100 pmoles de chacun des 2 amorces, 200 mM des
20 divers dNTP et 2,5 U de Taq DNA polymérase dans un tampon TRIS-HCl 10 mM pH 8,4 avec MgCl₂ 1,5 mM et KCl 50 mM, DMSO 2 %. A la fin des 40 cycles, les tubes PCR passent 10 min à 72°C.

 Après amplification, 0,04 ml de la solution fut
25 prélevée afin de réaliser l'hybridation sandwich sur la sonde trappeur fixée sur les multipuits commune aux deux amplicons. La présence d'amplicons cible et d'amplicons standard fut mise en évidence grâce à une sonde de 40 bases biotinylée spécifique de chacune des 2 séquences (fig 3).

30 La réalisation s'est faite en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et en mesurant l'activité de la kinase bioluminescence. Les conditions expérimentales pour

l'hybridation et la révélation sont celles de l'exemple 1. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 8. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures. On remarque une corrélation entre le nombre de copies de départ et le signal obtenu. De plus, les courbes obtenues pour le cible et le standard sont très proches, ce qui permet d'utiliser la courbe du standard comme référence pour déterminer le nombre de copies du DNA cible CMV dans l'échantillon de départ.

10 **Exemple 5 Mesure de la quantité d'ADN cible de CMV par utilisation d'un standard interne par hybridation sandwich après amplification par PCR**

15 Afin de valider la méthode de mesure d'un ADN cible dans un échantillon en utilisant un standard interne et une amplification par PCR comme schématisée à la figure 5, on établit une courbe de standardisation de la manière suivante.

20 Dans chacun des tubes ont été ajoutées des quantités croissantes d'un plasmide contenant la génome du virus CMV et une quantité constante de standard interne soit équivalent à 1 000 copies. Les quantités d'ADN cible CMV correspondaient à 30, 100, 300, 1 000, 3 000, 10 000, 30 000, 100 000, 300 000, et 1 million de copies.

25 La composition du standard interne est donnée à la figure 3. Chaque tube a été soumis à une amplification par 40 cycles de PCR dans les conditions présentées à l'exemple 5 en utilisant les amorces correspondant à la séquence 3191-3217 et 3504-3481 du gène de CMV (figure 3).
30 Après amplification, on obtient donc des amplicons de 314 paires de bases correspondant au cible CMV et au standard. De chacune des solutions de PCR, 0,04 ml sont prélevés et

incubés dans 2 puits contenant un trappeur identique pour les séquences communes des 2 amplicons. Dans l'un des puits, est ajouté la sonde biotinylée de 40 bases spécifique du cible CMV et dans l'autre la sonde biotinylée de 40 bases spécifique du standard.

Après hybridation sandwich, un conjugué streptavidine-peroxydase est ajouté à chaque tube et l'activité à la peroxydase mesurée comme dans l'exemple 5 par la mesure de la densité optique (D.O.) correspondant à l'absorbance du produit de réaction de la peroxydase (figure9). Pour chaque PCR, le rapport entre la D.O. correspondant à la détection des amplicons cibles et celle correspondant à la détection des amplicons standards est déterminé et porté en fonction du nombre de copies de CMV présent au départ de l'expérience. Les résultats sont présentés à la figure 10 en échelle logarithmique afin de couvrir l'ensemble des concentrations. Chacun des points représente la moyenne de 3 expériences. On observe une très bonne linéarité avec un coefficient de régression de 0,97 pour la droite, ce qui signifie la possibilité de déterminer la quantité de CMV cible dans un échantillon de départ allant de 30 à 1 million de copies.

Exemple 6 Indépendance du nombre de cycles de PCR pour la mesure d'un ADN cible de CMV par utilisation d'un standard interne et hybridation sandwich

Cette expérience a été réalisée essentiellement comme pour l'expérience décrite dans l'exemple 5 et selon le schéma de la figure 5 c'est-à-dire en utilisant au départ un échantillon contenant 100 000 copies d'ADN de CMV dilué de 10 en 10 fois et auquel nous avons ajouté 1 000 copies de standard. Chacun de ces tubes a été soumis à une PCR comme

dans l'exemple 5 excepté que certains tubes ont été arrêtés après 25, 30, 35, ou 40 cycles de PCR. Après la PCR, les amplicons ont été utilisés pour une hybridation sandwich sur un même trappeur mais avec soit une sonde biotinylée
5 spécifique du CMV cible ou du standard. La révélation s'est faite en bioluminescence en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et mesure de la lumière émise par la luciférase (cfr. exemple 1).

Le rapport des signaux lumineux (RLU) émis par
10 les puits utilisant la sonde du cible et ceux utilisant la sonde standard ont été portés en fonction de la dilution du cible de départ (figure 11). Pour une même PCR, on observe la linéarité des 4 points, ce qui signifie la détection possible dans ce cas du CMV cible entre 100 et 100 000
15 copies. Cette linéarité est retrouvée pour les 4 PCR comprenant 25-30-35 ou 40 cycles, ce qui signifie l'indépendance de cette quantification par rapport au nombre de cycles d'amplification de la PCR.

20 **Exemple 7 Mesure de la quantité d'ARN cible et de standard par hybridation sandwich**

L'ARN cible à mesurer consiste en un acide nucléique simple brin de 324 bases correspondant à la séquence nucléotidique allant de 2566 à 2889 du gène de la
25 polymérase (Pol) du virus du Sida (HIV).

Le standard consiste en un acide nucléique simple brin ARN de 324 bases dont la composition en nucléotides est identique à celle de l'ARN cible à mesurer à l'exception de 38 nucléotides allant de la position 2698
30 à 2735, constituant une séquence aléatoire dont le pourcentage en GC est similaire à celui de l'ARN cible. La composition de ces ARN est présentée à la figure 4.

Le standard ARN est préparé par transcription *in vitro* à partir d'un plasmide possédant en 5' le promoteur d'une ARN polymérase et en 3' d'une séquence poly A. Après purification et quantification de ce dernier, un nombre de

5 copies croissant de standard ARN est placé dans chaque tube en présence d'une quantité fixe d'ARN cible.

Chaque tube est soumis à une première étape de transcription inverse (AMV-RT, Avian Myeloblastosis Virus) pour la synthèse du premier brin ADN (amorce 2869-2889) et

10 dans une seconde étape à la synthèse du second brin d'ADNc ainsi que l'amplification de l'ADN (Tfl ADN polymérase *Thermus flavus*; System Access RT-PCR Promega) (amorces 2566-2588; 2869-2889). Un tampon de réaction optimisé pour les deux étapes simplifie la procédure et réduit le risque de

15 contamination.

La procédure d'amplification comprend dans une première étape la transcription inverse à 48°C pendant 60 min, suivie d'une étape d'inactivation de l'AMV-RT et de la dénaturation des hybrides ARN/ADNc à 94°C pendant 2 min.

20 Ensuite, la synthèse du second brin d'ADNc et la PCR sont réalisées par une amplification de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, un appariement des amorces à 55°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec. La réaction de RT-PCR se déroule dans 50

25 µl de solution comprenant en concentration finale 1 µM de chacune des 2 amorces, 0,2 mM de dNTPs, tampon de réaction AMV/Tfl, 1 mM MgSO₄, 0,1 u/µl AMV-RT et 0,1 u/µl Tfl ADN polymérase.

Après amplification, l'hybridation sandwich est

30 réalisée sur la sonde trappeur commune aux deux amplicons fixée sur les multipuits. La présence d'amplicons cibles et standards fut mise en évidence grâce à une sonde de 38 bases

biotinylée et spécifique de chacune des 2 séquences. La révélation est faite en bioluminescence en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et mesure de la lumière émise par la luciférase (Cfr. exemple 1).

5 Les résultats d'une telle expérience dans laquelle 3 concentrations différentes de standards internes de 10^{10} , 10^8 , et 10^6 copies ont été ajoutées à une concentration fixe de 10^8 copies d'ARN de HIV cible sont montrés à la figure 12.

REVENDICATIONS

1. Procédé de quantification d'une séquence nucléotidique cible (2) présente dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- 5 - une préparation d'une quantité connue d'une séquence nucléotidique standard (1) possédant au moins une partie (A) commune à la séquence nucléotidique cible (2) et une partie spécifique (B) dont la séquence est différente, et possède un contenu en base GC/AT proche, de préférence identique à
- 10 la séquence d'une partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2),
- une extraction éventuelle de la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier de l'échantillon biologique,
- une mise en contact de type "sandwich" des séquences
- 15 nucléotidiques cible (2) et standard (1) avec des séquences nucléotidiques "trappeur" (5) fixées de manière directe ou indirecte sur un support insoluble et complémentaires de la partie commune (A) de ces 2 séquences et avec des séquences nucléotidiques marquées (6) complémentaires soit de la partie
- 20 spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2) ou soit de la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique standard (1),
- une quantification du rapport entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible (2) et le marquage
- 25 spécifique de la séquence nucléotidique standard (1).

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'extraction éventuelle de la séquence nucléotidique cible à quantifier de l'échantillon biologique s'effectue avant ou après l'addition à l'échantillon

30 biologique de la séquence nucléotidique standard (1).

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la partie spécifique (B) de la séquence

nucléotidique standard (1) est différente de la partie spécifique (B) de la séquence cible (2) par 5 à 500 nucléotides, de préférence par 20 à 40 nucléotides.

4. Procédé de quantification selon l'une
5 quelconque des revendications précédentes 1 à 3 caractérisé en ce que le standard interne (1) comporte de part et d'autre de la séquence spécifique (B) et commune (A) des parties (3) communes à des parties (3) de la séquence nucléotidique cible (2) et pouvant servir en totalité ou en partie de séquence
10 complémentaire à des séquences amorces (4) pour une amplification génétique.

5. Procédé de quantification selon l'une
quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que
préalablement à la mise en contact de type "sandwich", la
15 séquence nucléotidique cible (2) et la séquence nucléotidique standard (1) sont préalablement amplifiées par un procédé d'amplification génétique, de préférence par PCR ou LCR.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la séquence nucléotidique standard (1) est un
20 standard interne amplifié conjointement avec la séquence nucléotidique cible (2).

7. Procédé de quantification selon la revendication 5 caractérisé en ce que la séquence nucléotidique standard (1) est un standard externe amplifié
25 en parallèle avec la séquence nucléotidique cible (2).

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 5 à 7 caractérisé en ce que le procédé de quantification comporte un nombre élevé de cycles d'amplification, de préférence supérieur à 30.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 8 caractérisé en ce que les séquences nucléotidiques marquées (6) complémentaires de la

partie (B) de la séquence nucléotidique cible (2) ou complémentaires de la partie (B) de la séquence nucléotidique standard (1) sont marquées de manière directe ou indirecte par une ou plusieurs molécules chimiques (7) permettant leur
5 détection par un procédé choisi parmi le groupe constitué par la fluorescence, la chemoluminescence, l'électroluminescence, la coloration, le marquage radioactif, la bioluminescence ou un mélange d'entre eux.

10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 9 caractérisé en ce que la séquence nucléotidique cible (2) est un ADN ou un ARN, de préférence choisi parmi le groupe constitué par les ARN viraux, les ARN messagers et les ARN ribosomiaux tels que les ARN 16S et 23S.

15 11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que les séquences nucléotidiques sont des séquences de micro-organismes (tels que des bactéries, des virus, ou des champignons) de plantes, d'animaux ou de l'homme.

20 12. Procédé de quantification selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est également un procédé de diagnostic.

25 13. Procédé de quantification selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le standard interne est ajouté en quantités variables à l'échantillon de départ et que le rapport obtenu entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible (2) et le marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard (1) sont portés en graphique en fonction des
30 quantités standards ajoutées à l'échantillon de départ, permettant de déterminer sur la droite ainsi obtenue pour un rapport égal à 1 quelle est la quantité d'acides nucléiques

cible (2) présente dans l'échantillon.

14. Procédé de quantification selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 12 caractérisé en ce que le standard est ajouté en quantités identiques à
5 un échantillon ayant subi diverses dilutions et que le rapport entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible et le marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard sont portés en graphique en fonction des dilutions de l'échantillon

10 et que la droite obtenue permet de déterminer pour un rapport égal à 1 quelle est la quantité d'acides nucléiques cibles (2) présente dans l'échantillon.

15 15. Séquence nucléotidique standard (1) possédant au moins une partie (A) commune à une séquence nucléotidique cible (2) à quantifier et une partie spécifique (B) dont la séquence est différente, et possède un contenu en base GC/AT proche, de préférence identique à la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier.

20 16. Séquence nucléotidique standard (1) selon la revendication 15 caractérisée en ce que la partie spécifique (B) se différencie de la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier par 5 à 500 nucléotides, de préférence par 20 à 40 nucléotides.

25 17. Séquence nucléotidique standard (1) selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce qu'elle comporte de part et d'autre de la séquence spécifique (B) et commune (A) des parties (3) communes à des parties (3) de la séquence nucléotidique cible (2) et pouvant servir en totalité ou en
30 partie de séquences complémentaires à des séquences amorces (4) pour une amplification génétique.

18. Séquence nucléotidique standard (1) selon

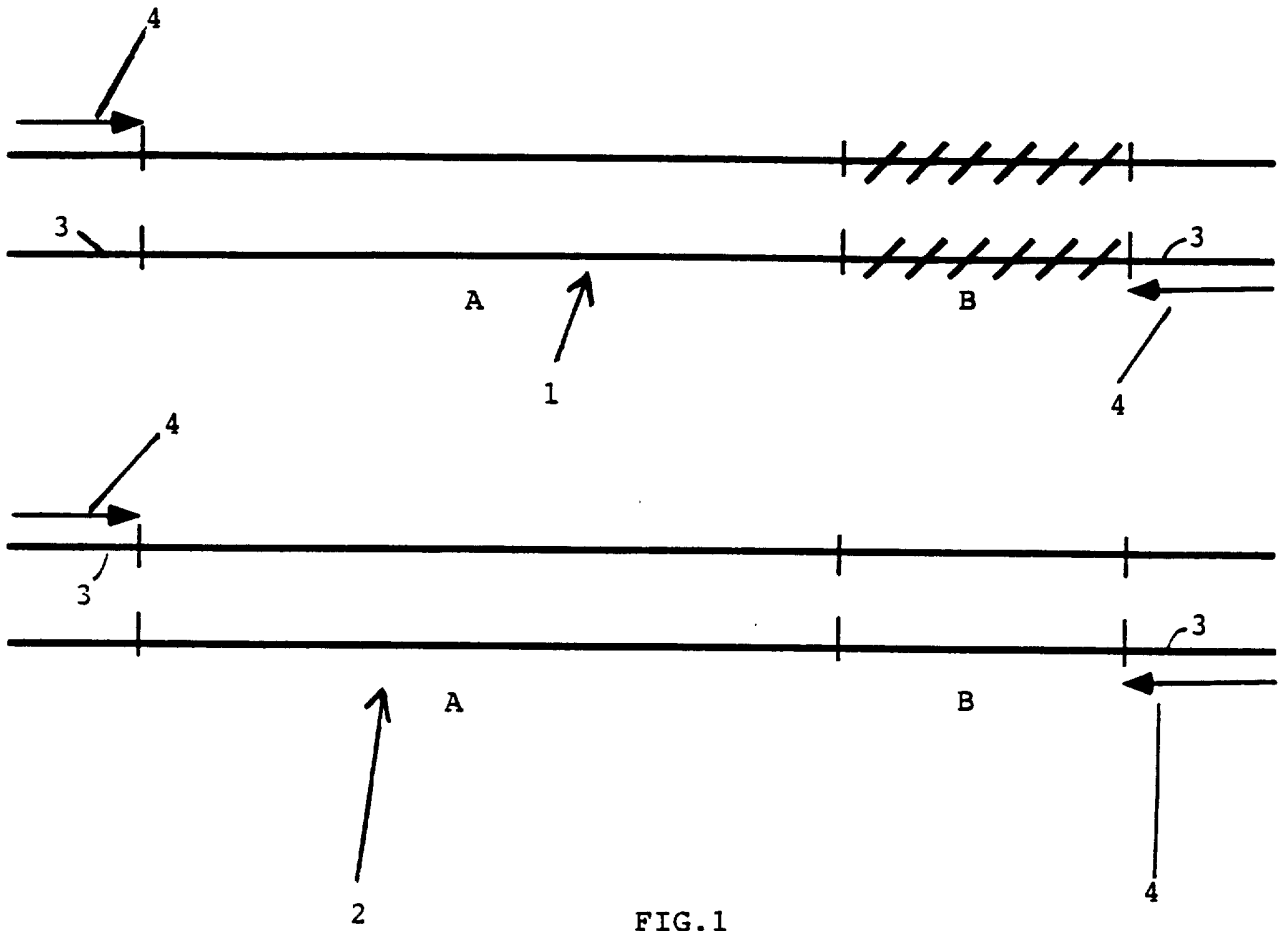
l'une quelconque des revendications précédentes 15 à 17 caractérisée en ce qu'il est un standard interne ou un standard externe.

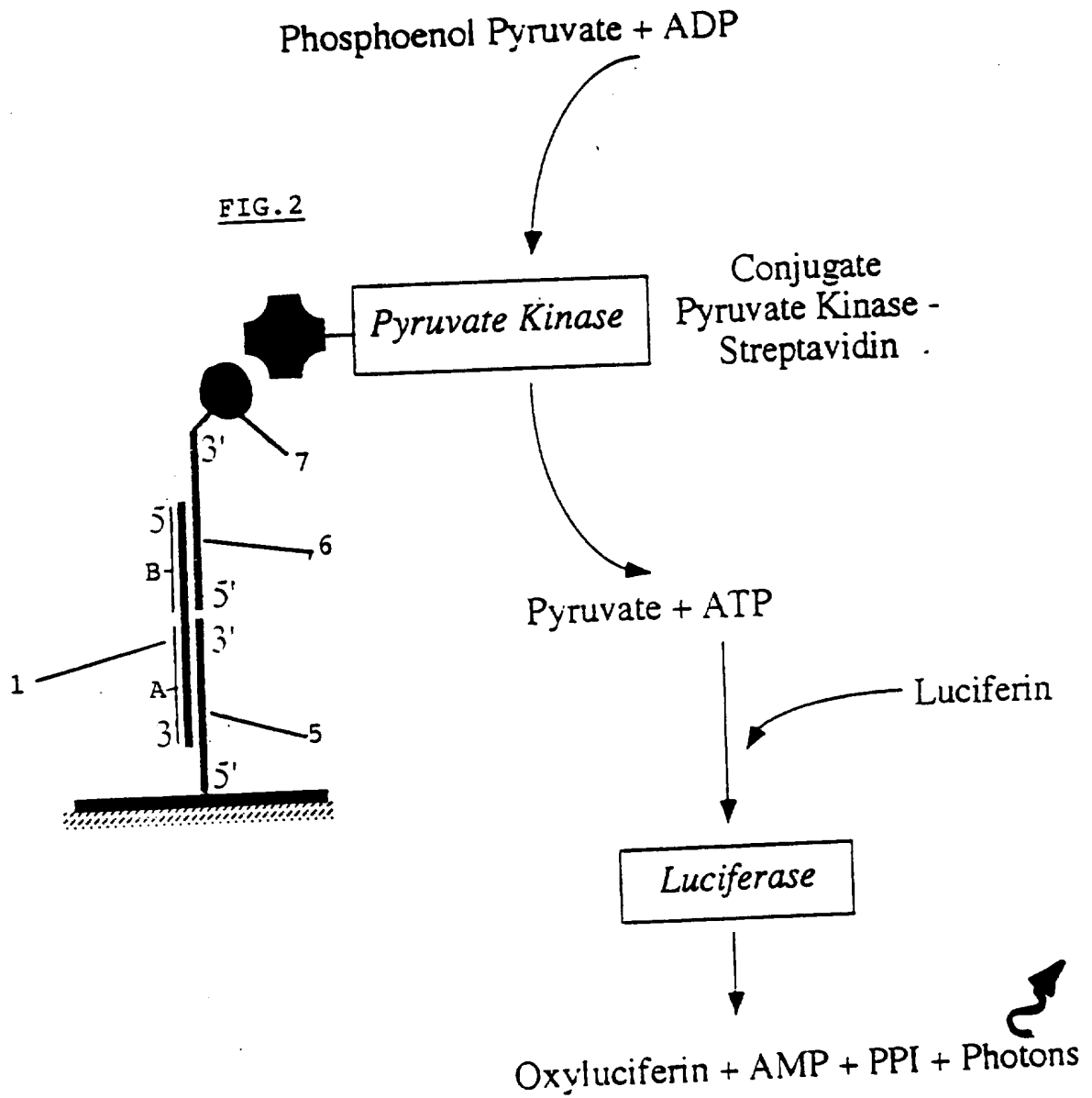
5 19. Trousse de quantification d'une séquence nucléotidique cible (2) caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence nucléotidique standard (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes 15 à 18.

10 20. Trousse de quantification selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle comporte, fixées sur un support insoluble, des séquences nucléotidiques "trappeur" (5) complémentaires de la partie commune (A) de la séquence nucléotidique cible (2) et de la séquence nucléotidique standard (1) et des séquences nucléotidiques marquées (6) complémentaires de la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2) ou complémentaires de la séquence nucléotidique standard (1) et éventuellement des amorces (4) pour l'amplification génétique de la séquence nucléotidique standard (1) et séquence nucléotidique cible (2).

20 21. Trousse de diagnostic selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle comporte des moyens pour la quantification du rapport entre un marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible (2) un marquage spécifique de la séquence standard (1).

25 22. Trousse de quantification selon la revendication 21 caractérisée en ce que les moyens de quantification sont des moyens utilisés dans un procédé choisi parmi le groupe constitué par la fluorescence, la chemoluminescence, la coloration, la reconnaissance de
30 marquage radioactif, la bioluminescence, ou un mélange d'entre elles.

FIG. 1



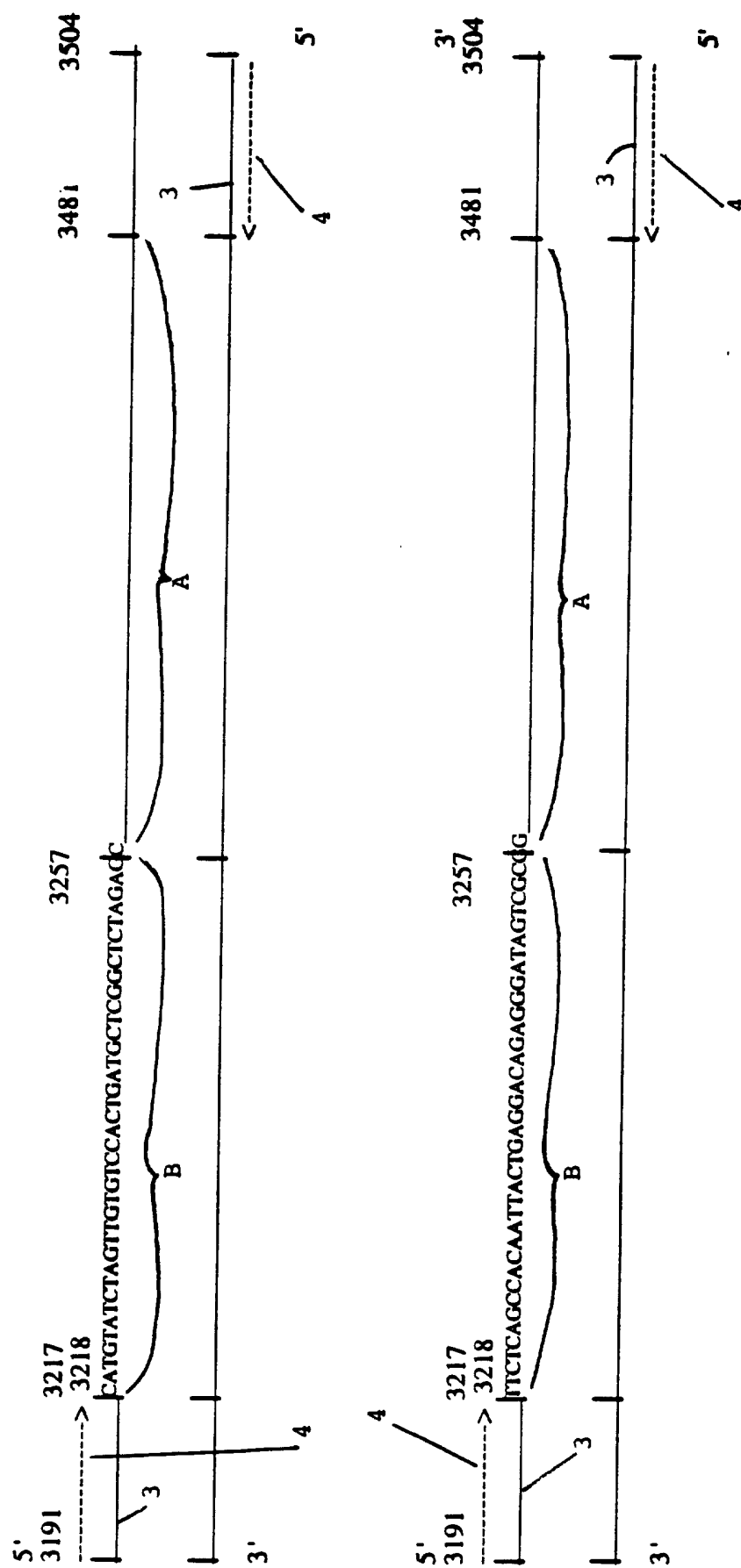


FIG. 3

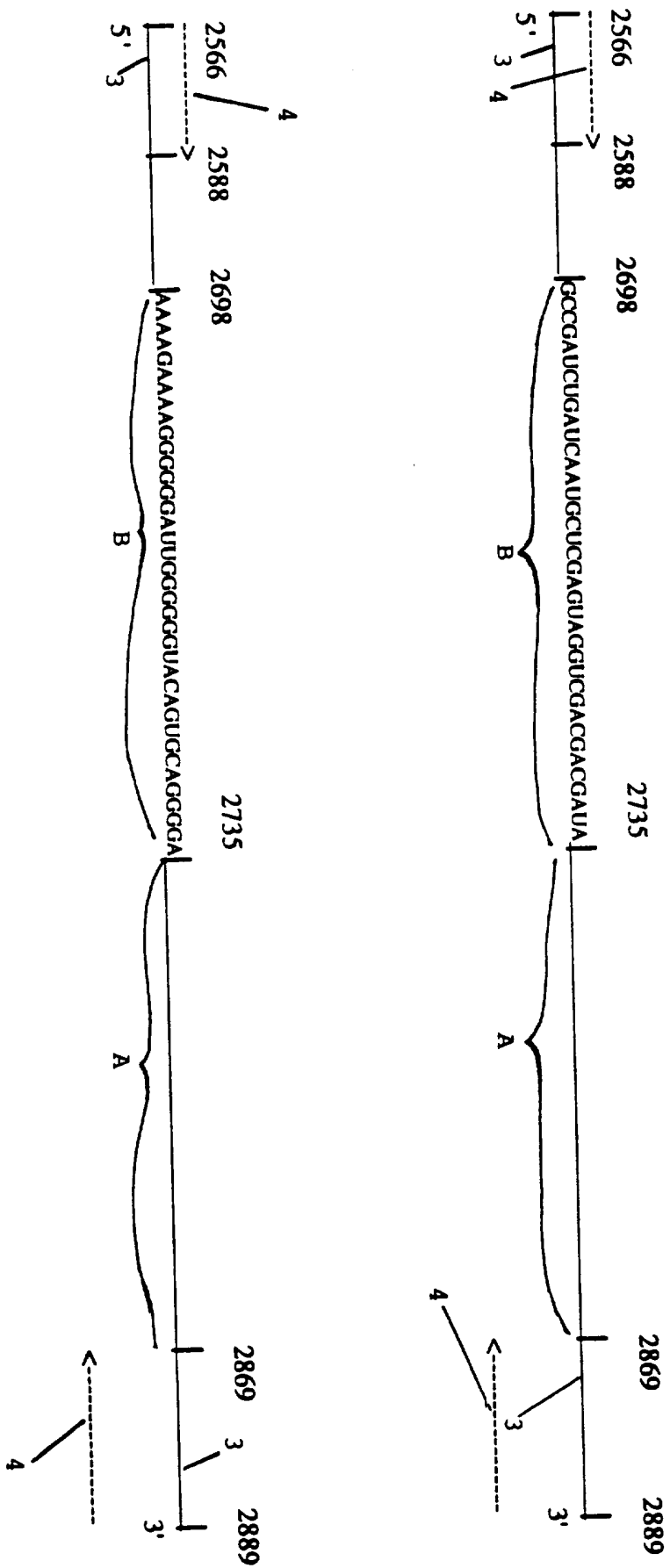
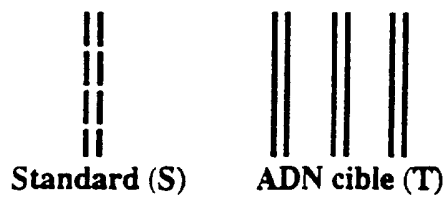
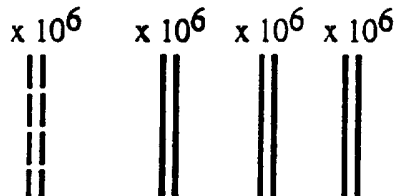


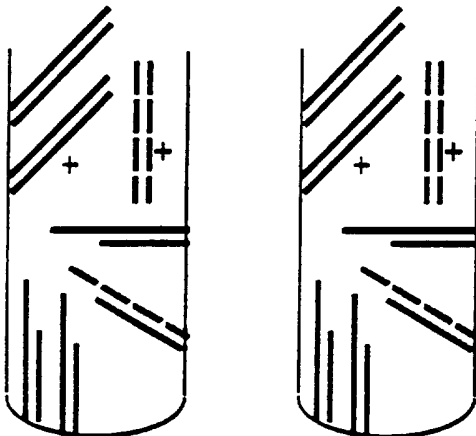
FIG. 4

1) Composition de l'échantillon

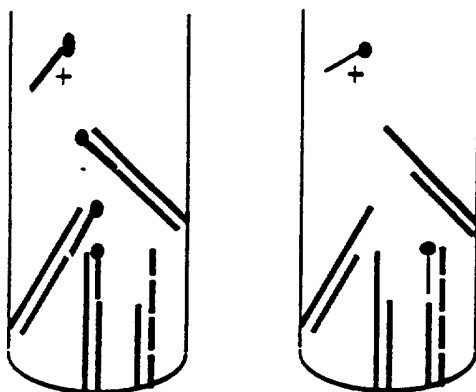
$$\text{rapport } \frac{T}{S} = 3$$

2) Amplification par PCR

$$\text{rapport des amplicons } \frac{T}{S} = 3$$

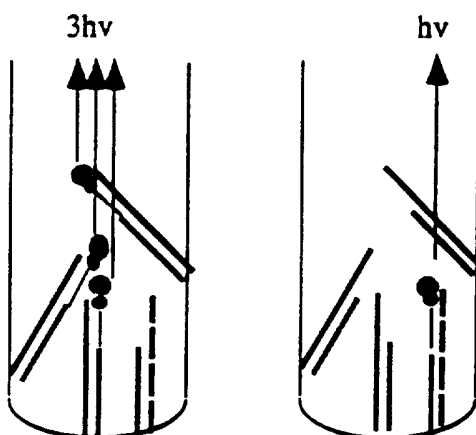
3) Fixation sur la sonde capteur

$$\text{rapport des amplicons capturés } \frac{T}{S} = 3$$

4) Fixation de sondes de détection spécifiques

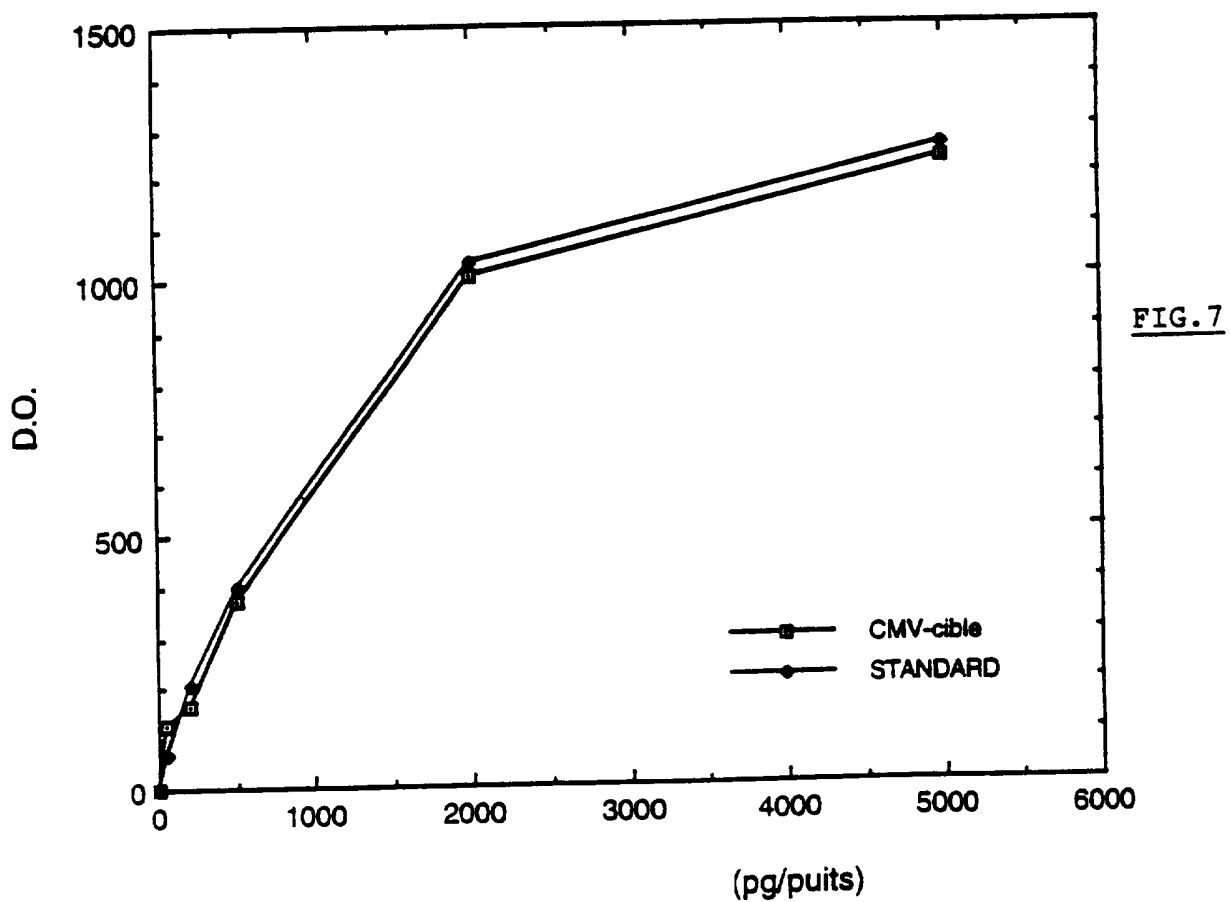
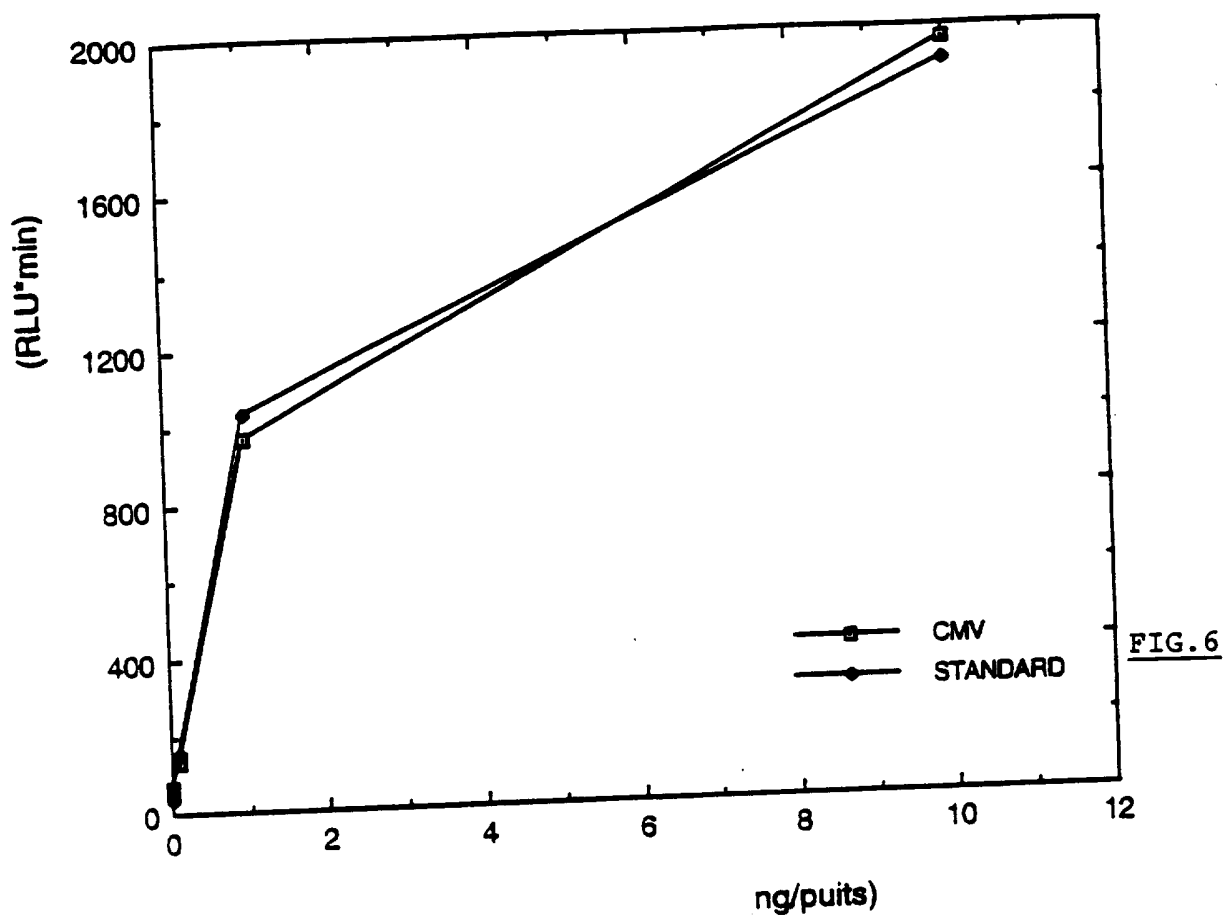
—● T probes, —● S probes

$$\text{rapport des sondes de détection spécifiques } \frac{T}{S} = 3$$

5) Détection des sondes marquées

$$\text{rapport des signaux } \frac{T}{S} = 3$$

FIG. 5



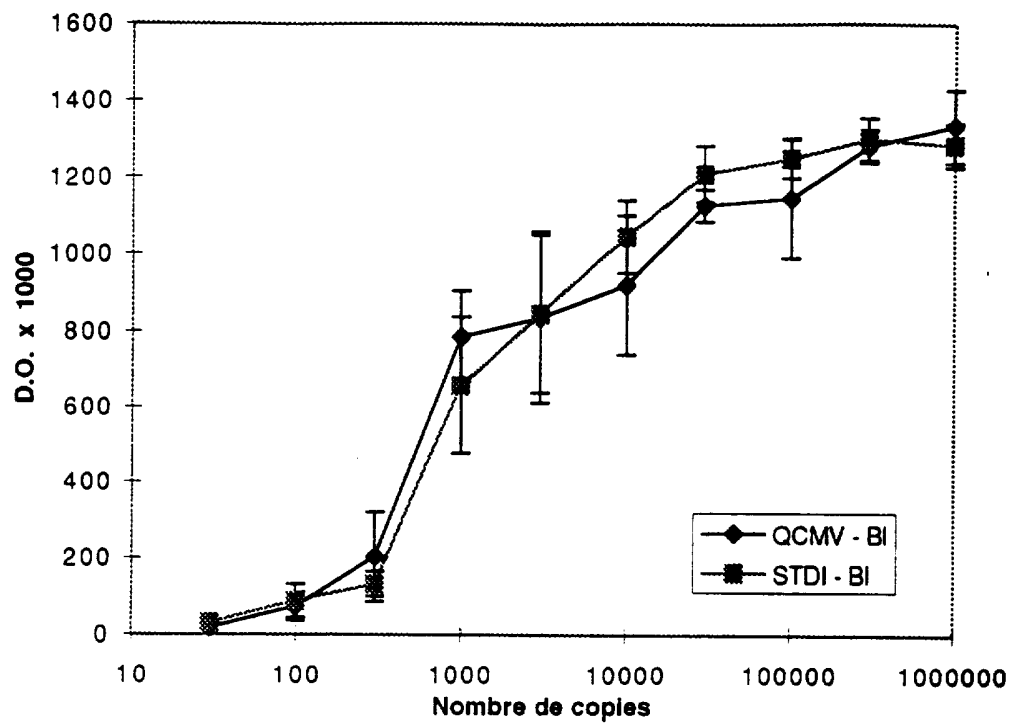


FIG. 8

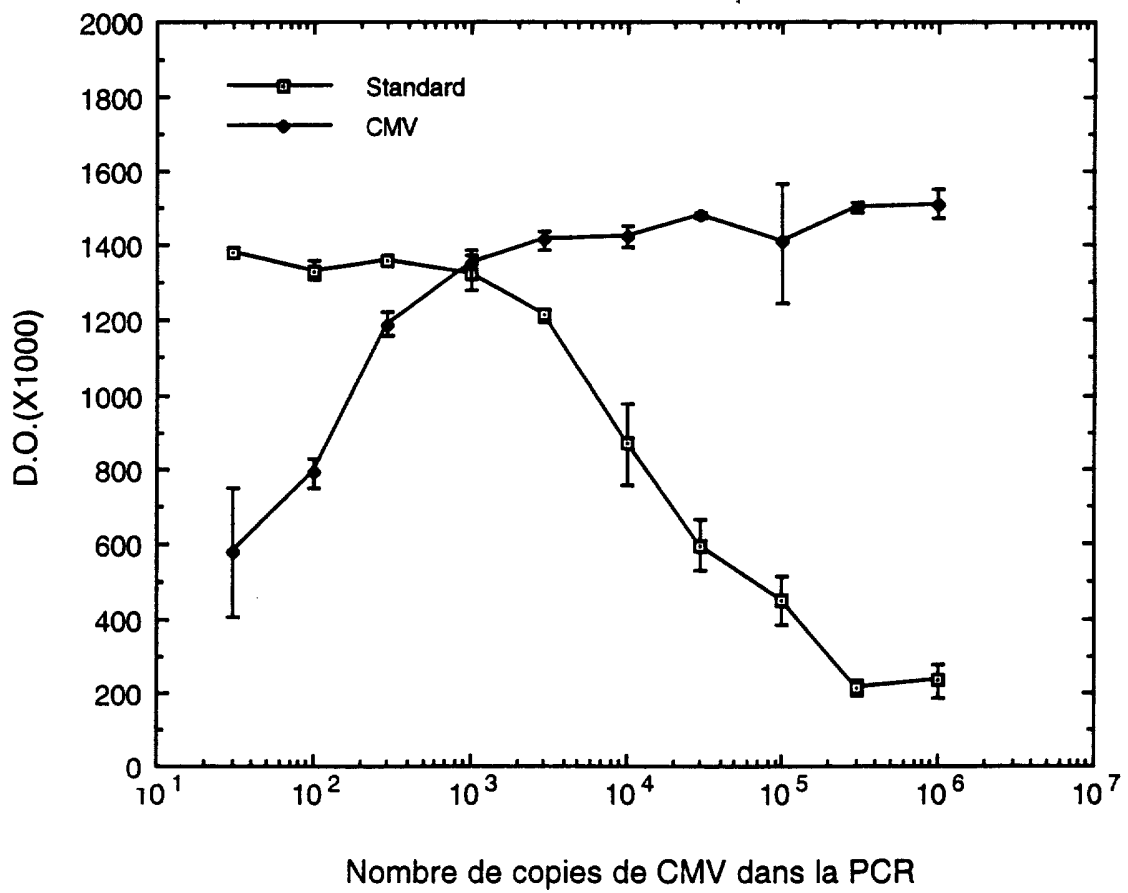
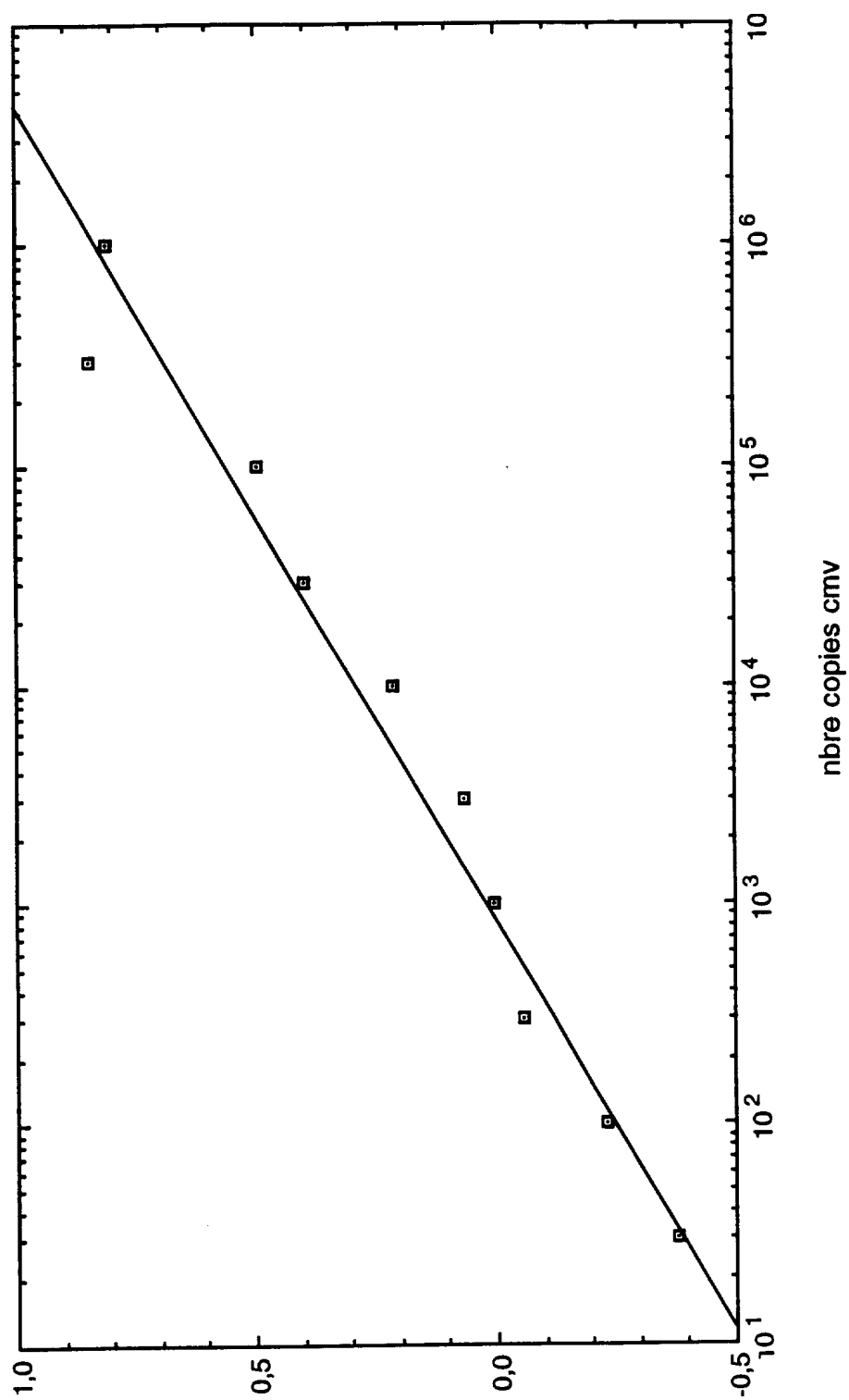


FIG. 9

FIG.10

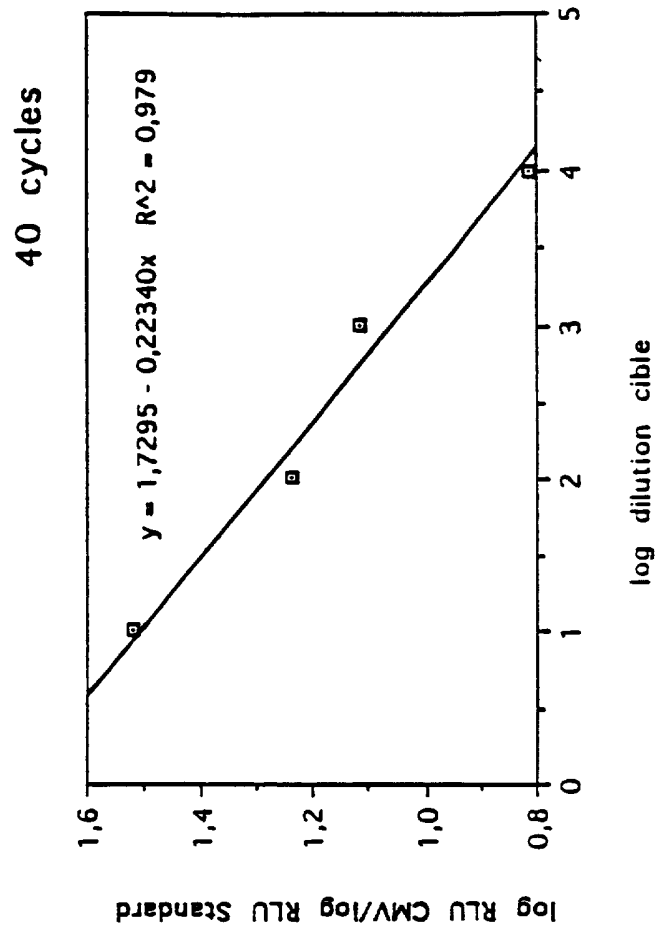
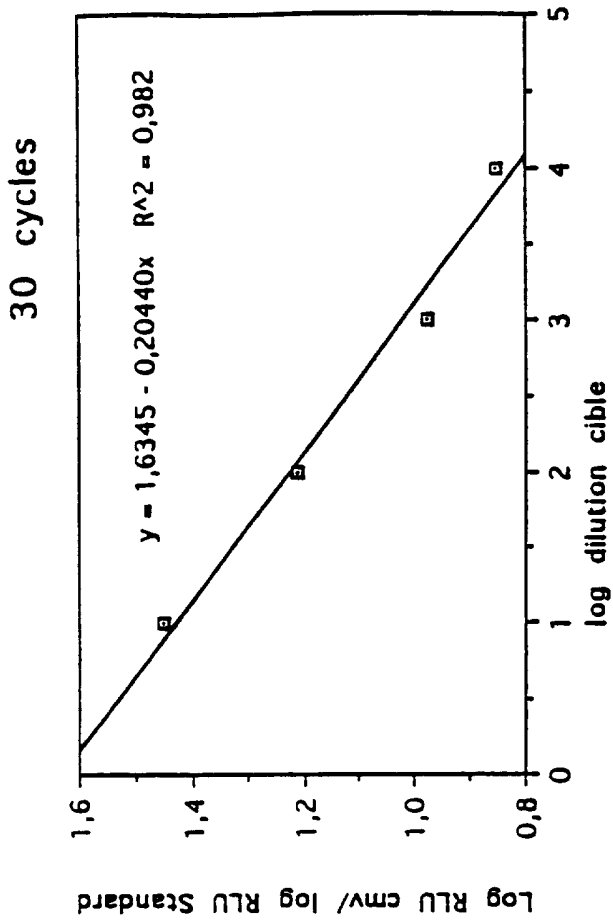
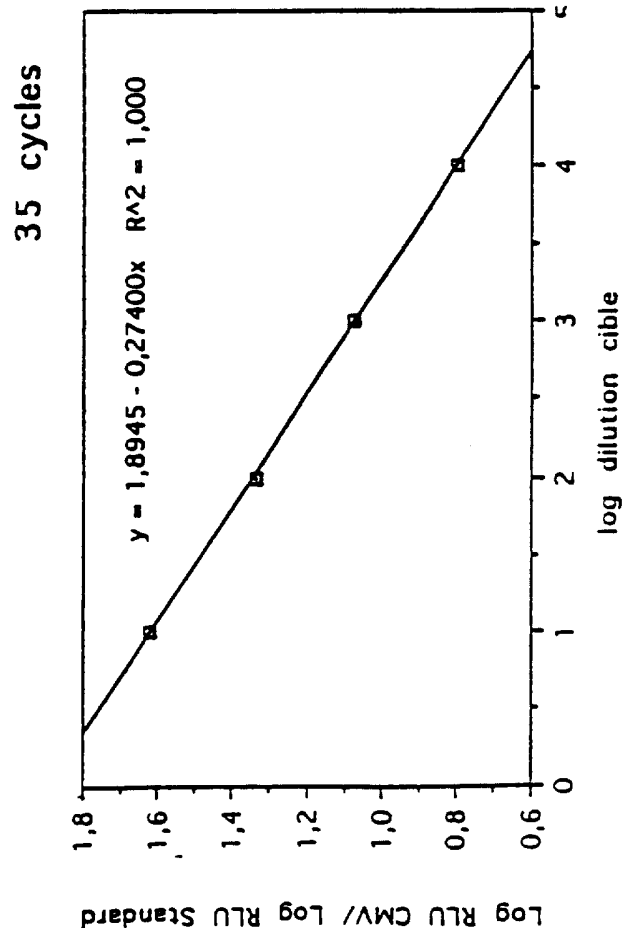
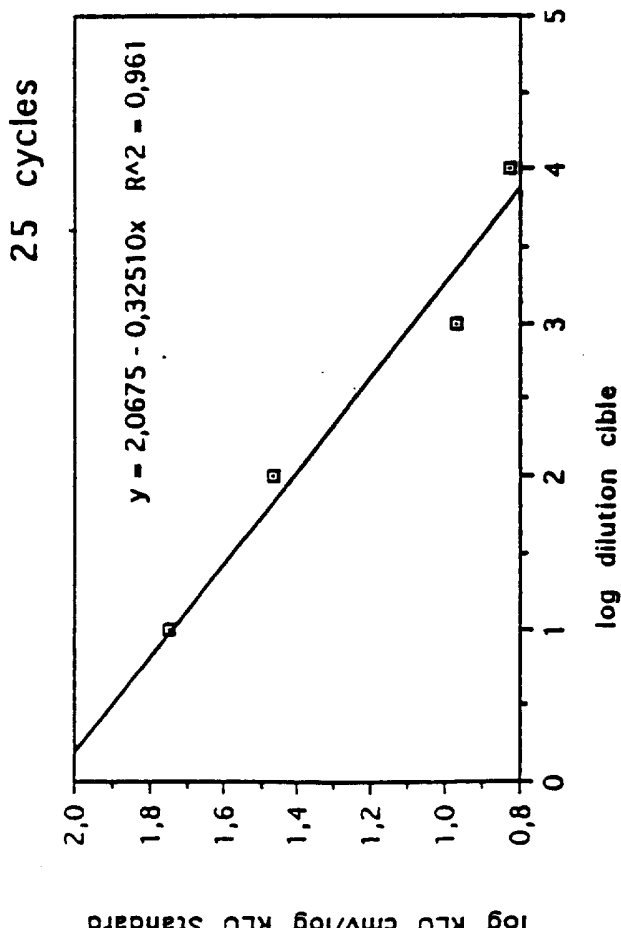
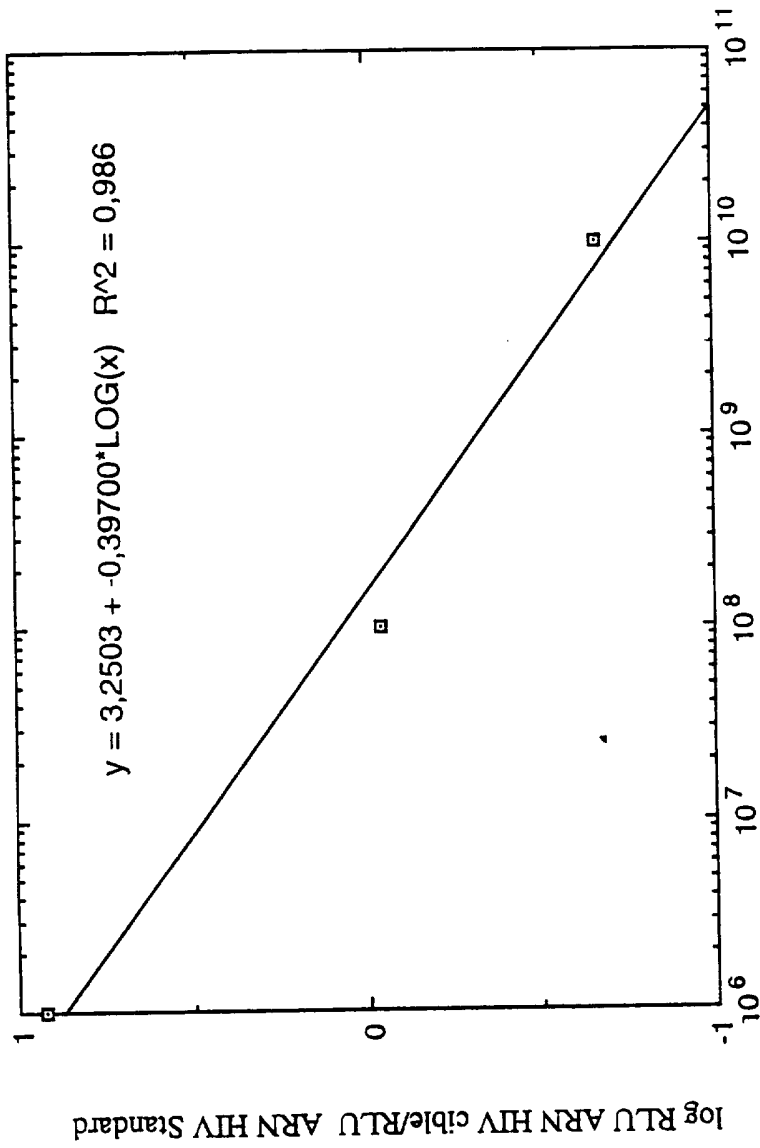


FIG.11



FIG. 12



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 6258
BE 9600755

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	WO 96 09407 A (PHARMACIA BIOSENSOR AB ;NILSSON PETER (SE); NYGREN PER AAKE (SE);) 28 Mars 1996 * page 3, ligne 4 - ligne 12; revendications; figures * * le document en entier * ---	1-8, 10-13, 15-21	C12Q1/68
X	WO 93 10257 A (INST NAT SANTE RECH MED ;PASTEUR INSTITUT (FR)) 27 Mai 1993 * abrégé; revendications * ---	1-6,8-22	
X	BIOTECHNIQUES, vol. 21, no. 2, 1 Août 1996, pages 268-270, 274 - 279, XP000597689 ZIMMERMANN K ET AL: "TECHNICAL ASPECTS OF QUANTITATIVE COMPETITIVE PCR" * le document en entier * ---	1-6,8-22	
A	WO 94 04706 A (AKZO NV ;KIEVITS TIM (NL); LENS PETER FRANKLIN (NL)) 3 Mars 1994 * page 4, ligne 22; revendications * ---	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
A	US 5 213 961 A (BUNN H FRANKLIN ET AL) 25 Mai 1993 * abrégé; revendications * ---	1-22	C12Q
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 236, no. 1, 5 Avril 1996, pages 146-152, XP000582427 WILLIAMS S J ET AL: "QUANTITATIVE COMPETITIVE POLYMERASE CHAIN REACTION: ANALYSIS OF AMPLIFIED PRODUCTS OF THE HIV-1 GAG GENE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION" * voir résultats et discussion * ---	1-22	
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 Juin 1997		Müller, F	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arriére-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 03.92 (P04C48)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 6258
BE 9600755

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 229, no. 2, 10 Août 1995, pages 236-248, XP000533292 HAHN M ET AL: "QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION WITH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY DETECTION OF SELECTIVELY DIGESTED AMPLIFIED SAMPLE AND CONTROL DNA" * le document en entier * -----	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 Juin 1997		Müller, F	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant			

2

EPO FORM 1503 01.12 (P04C4)

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

BO 6258
BE 9600755

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

03-06-1997

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9609407 A	28-03-96	AUCUN	

WO 9310257 A	27-05-93	FR 2683827 A	21-05-93
		AT 148924 T	15-02-97
		CA 2123680 A	27-05-93
		DE 69217501 D	27-03-97
		EP 0613503 A	07-09-94
		JP 7501215 T	09-02-95

WO 9404706 A	03-03-94	AU 4951393 A	15-03-94
		CA 2143202 A	03-03-94
		EP 0656955 A	14-06-95
		FI 950836 A	23-02-95
		JP 8500732 T	30-01-96
		ZA 9306015 A	10-03-94

US 5213961 A	25-05-93	AUCUN	
