PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

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

(51) **Classification internationale des brevets** [5] : **C07H 21/00, C12Q 1/68, C25B 3/10, 11/04, C08G 61/12** — **A1**

(11) **Numéro de publication internationale:** **WO 94/22889**

(43) **Date de publication internationale:** 13 octobre 1994 (13.10.94)

(21) **Numéro de la demande internationale:** PCT/FR94/00354

(22) **Date de dépôt international:** 30 mars 1994 (30.03.94)

(30) **Données relatives à la priorité:**
93/03732 31 mars 1993 (31.03.93) FR

(71) **Déposant** *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; R.N. 306, F-91400 Saclay (FR).

(72) **Inventeurs; et**
(75) **Inventeurs/Déposants** *(US seulement)*: TEOULE, Robert [FR/FR]; 52, rue Thiers, F-38000 Grenoble (FR). ROGET, André [FR/FR]; Pavillon 12, 15, rue de la Contamine, F-38120 Saint-Egrève (FR). LIVACHE, Thierry [FR/FR]; 22, rue Félix-Esclangon, F-38000 Grenoble (FR). BARTHET, Christelle [FR/FR]; 7, rue des Charmettes, F-38600 Fontaine (FR). BIDAN, Gérard [FR/FR]; 3, rue des Trois-Epis, F-38100 Grenoble (FR).

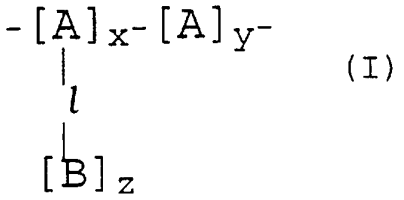
(74) **Mandataires:** ORES, Irène etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) **Etats désignés:** JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) **Title:** ELECTRONICALLY CONDUCTIVE POLYMER/NUCLEOTIDE COPOLYMER, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) **Titre:** COPOLYMERE NUCLEOTIDE(S)/POLYMERE CONDUCTEUR ELECTRONIQUE, SON PROCEDE DE PREPARATION ET SON UTILISATION



(I)

(57) **Abstract**

A copolymer of general formula (I), wherein unit A is a monomer of an electronically conductive polymer, unit B is a nucleotide, an oligonucleotide or an analogue thereof, x, y, z are integers of 1 or higher or y is 0, and *l* is a covalent bond, or a spacer arm. Methods for preparing said polymer and its use, in particular for nucleic acid synthesis, sequencing and hybridization, are also disclosed.

(57) **Abrégé**

L'invention concerne un copolymère, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (I) dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, et *l* représente une liaison covalente, ou un bras espaceur. L'invention englobe également des procédés de préparation dudit polymère, ainsi que ses utilisations, en particulier pour la synthèse et le séquençage, et l'hybridation des acides nucléiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

COPOLYMERE NUCLEOTIDE(S)/POLYMERE CONDUCTEUR ELECTRONIQUE, SON PROCEDE DE PREPARATION ET SON UTILISATION.

La présente invention est relative à la fixation d'acides nucléiques sur un polymère conducteur électronique (PCE).

Dans un grand nombre de techniques couramment utilisées en biologie, par exemple la synthèse ou l'hybridation d'acides nucléiques, des oligonucléotides sont fixés de façon covalente par leur extrémité à un support solide. Différents supports ont été utilisés dans ce but : le papier, le nylon, le verre, la silice, le polystyrène, le polyacrylamide, etc...

A l'heure actuelle, de nombreuses équipes cherchent à obtenir des supports portant un grand nombre d'oligonucléotides de séquences différentes, disposées selon un arrangement préétabli, afin de réaliser simultanément différentes réactions (hybridation sur support par exemple).

C'est ainsi que, par exemple, cette approche a été proposée pour faciliter le séquençage des acides nucléiques.

Des oligonucléotides différents disposés en rangées et colonnes sur des microsurfaces (matrices d'oligonucléotides sur support) ont été proposés pour séquencer les acides nucléiques [LYSOV et al, Proc. USSR Acad. Sci., 303, 1508- 1511, (1988) ; KHRAPKO et al., FEBS Lett. 256, 118-122, (1989) ; KHRAPKO et al., DNA Séquence, vol 1, 375-388 (1991) ; BAINS & SMITH, J.Theor.Biol. 135, 303-307, (1988) ; CHURCH & KIEFFER-HIGGINS, Science 240, 185-188 (1988) ; SOUTHERN, Demande PCT WO89/10977 (1989)]. La méthode est basée sur l'hybridation de chaînes d'ADN ou d'ARN cibles sur un ensemble d'oligonucléotides. Théoriquement, la présence ou l'absence d'une séquence dans l'acide nucléique cible peut être déterminée par l'hybridation observée sur les micro-surfaces dans des conditions de stringence déterminées.

En ce qui concerne la synthèse *in situ* de polynucléotides ou de polypeptides, FODOR et al. [Science, 251, 767-773 (1991)], en combinant les méthodes de la synthèse chimique en phase solide, les groupements photolabiles et la photolithographie, ont réussi à synthétiser 1024 peptides sur une matrice de points (carrés de 100 µm de côté). Ces peptides ont été obtenus par synthèses simultanées et parallèles, en utilisant des masques de photolithographie et des groupements protecteurs photolabiles des synthons peptidiques. Un dinucléotide dCpT a été préparé in situ, en utilisant la thymidine protégée en 5' par un groupement protecteur photolabile (5'-nitrovératryl thymidine). La lumière était dirigée par un masque de photolithographie et un dépôt en damier de 100 µm de côté a été obtenu.

MASKOS & SOUTHERN (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 1675-1678) ont réalisé, sous microscope, la synthèse in situ de quatre oligonucléotides différents sur une lame de verre.

Jusqu'à présent, les techniques utilisées pour le dépôt adressé d'oligonucléotides font appel, soit au dépôt manuel (qui n'est pas utilisable à l'échelon industriel), soit aux techniques de photolithographie, qui nécessitent l'utilisation de "masques" et en outre, sont difficilement applicables avec les acides nucléiques, qui sont photolabiles.

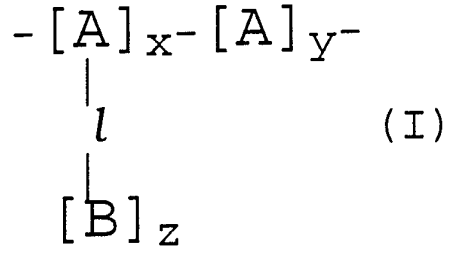
La présente Invention s'est fixé pour but l'obtention de nouveaux supports et de nouveaux procédés de fixation d'oligonucléotides, qui ne présentent pas les inconvénients des procédés proposés dans l'art antérieur.

Dans ce but, les Inventeurs ont eu l'idée d'utiliser comme support de fixation des polymères conducteurs électroniques.

Les Inventeurs sont maintenant parvenus à fixer par liaison covalente, et de façon stable, des nucléotides et des oligonucléotides sur un polymère

conducteur électronique, et à obtenir de la sorte de nouveaux copolymères.

La présente invention a pour objet un copolymère, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, et l représente une liaison covalente, ou un bras espaceur.

A titre d'exemple non limitatif de polymères conducteurs électroniques dont A représente un monomère on citera le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polypyrrole, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, etc...

Avantageusement, A est une unité pyrrole.

Dans le cadre de l'exposé de la présente Invention, on entend par analogue de nucléotide, tout nucléotide modifié, tels que ceux décrits par exemple par UHLMANN, [Chemical Review, 90:4, 543-584 (1990)].

Lorsque l'unité B est un nucléotide, il peut s'agir non seulement d'un de ceux qui entrent habituellement dans la composition des oligonucléotides naturels, mais également leurs analogues ou dérivés utilisés en laboratoire.

Il peut s'agir par exemple :

* d'analogues de nucléotides entrant dans la composition d'oligonucléotides synthétiques ;

* de dérivés de nucléotides portant des fonctions protégées qui sont couramment utilisés pour la synthèse des acides nucléiques ; B_z peut dans ce cas constituer un intermédiaire de synthèse d'un oligonucléotide.

B_z pourra aussi être un composé non naturel pouvant s'hybrider avec les acides nucléiques, tels que ceux décrits par UHLMANN (publication précitée).

Les unités B entrant dans la constitution de B_z peuvent être identiques ou différents, et B_z peut constituer un homopolymère ou un hétéropolymère ; dans ce dernier cas, les unités B peuvent s'enchaîner selon une séquence quelconque, prédéterminée ou non.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention le rapport x/y est compris entre 1/5 et 1/100.000

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, *l* représente un bras espaceur répondant à l'une des formules suivantes :

$$-R_1-[(CH_2)_n-R_2]_x-[CH_2)_m-R_3]_y-(CH_2)_p-$$

dans laquelle :

-n est un nombre entier de 1 à 10 ;

-m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

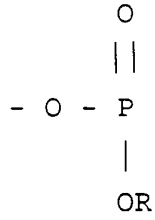
-p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

-x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

-y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

-R_1, R_2 et R_3 qui peuvent être identiques ou différents représentent :

CH2; O; S; NR'; CO; CH=CH ; NR'CO; CONR'; $NHSO_2$;



où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C_1 à C_{12}.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polymère conducteur électronique comme support pour la fixation par liaison covalente, d'au moins un nucléotide.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I).

Selon une première variante, ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes

- une première étape, au cours de laquelle on procède à la préparation d'un copolymère de formule générale (II) :

$$- [A^*]_x - [A]_y - \qquad (II)$$

dans laquelle A, x et y sont tels que définis précédemment, et A^* représente A fonctionnalisé.

- une deuxième étape au cours de laquelle on procède à la fixation, sur le polymère de formule (II) d'au moins un groupe de formule générale (III) :

$$l^* - [B]_z \qquad (III)$$

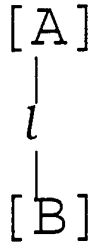
dans laquelle B et z sont tels que définis précédemment et l^* est un bras activé capable de se lier à A^*.

On entend par "fonctionnalisé" et "activé" au sens de la présente Invention, le résultat de toute modification chimique ayant pour but de pourvoir A et l de fonctions chimiques capables de réagir entre elles pour former une liaison covalente.

Selon une autre variante, le procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) est

caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une étape a) au cours de laquelle on procède à la préparation du composé de formule générale (IV) :



(IV)

dans lequel A, B, z, et l sont tels que définis ci-dessus,

- une étape b) au cours de laquelle on procède à la copolymérisation du composé (IV) avec le monomère A.

Avantageusement, au moins une étape de l'une ou l'autre des variantes du procédé conforme à l'invention fait intervenir au moins une réaction électrochimique. Cette copolymérisation électrochimique est avantageusement effectuée en surface d'une électrode ; en fin de réaction on obtient de la sorte une électrode dont la surface est constituée par un copolymère conforme à l'invention.

Par exemple, pour la mise en oeuvre de la première variante du procédé conforme à l'invention, l'étape de préparation du copolymère de formule générale (II) et/ou l'étape de fixation du groupe de formule générale (III) peuvent être effectuées par réaction électrochimique ; dans la seconde variante, l'étape b) est avantageusement effectuée par copolymérisation électrochimique du composé (IV) avec les monomères A.

La copolymérisation électrochimique est par exemple effectuée par voltampérométrie cyclique, en soumettant le mélange [(IV) : A] à des variations de potentiel électrique suffisantes pour provoquer la polymérisation par une oxydation et une réduction successives ; le

polymère formé étant conducteur, le cycle oxydation-réduction peut être répété plusieurs fois.

Les méthodes de polymérisation électrochimique généralement utilisées pour la préparation des PCE, telles que la polymérisation à courant (chronopotentiométrie) ou à potentiel (chronoampérométrie) imposés sont également applicables à la préparation des copolymères conformes à l'Invention.

La qualité du dépôt peut être contrôlée par le choix des conditions expérimentales : le rapport oligonucléotide-pyrrole/pyrrole, la température du bain, la nature du solvant, la méthode électrochimique utilisée (voltampèrométrie cyclique, chronoampèrométrie, chronopotentiométrie). Le copolymère obtenu peut de la sorte présenter des qualités de porosité et d'accessibilité différentes selon l'usage ultérieur souhaité, et la quantité d'oligonucléotide fixé peut être modulée.

Avantageusement, dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, les réactions électrochimiques sont effectuées à la surface d'une électrode. L'électrode permet en effet de contrôler, par mesure du courant délivré au cours de la réaction, l'évolution de la réaction de polymérisation (par exemple l'épaisseur du polymère formé), ou de réactions ultérieures effectuées sur le copolymère.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé conforme à l'invention dans l'une ou l'autre de ses variantes, il comprend en outre l'élongation de l'oligonucléotide B_Z, en plusieurs étapes successives, chacune de ces étapes étant constituée par la fixation d'un ou plusieurs unités B.

L'élongation de l'oligonucléotide B_Z s'effectue à la surface du support par assemblage de monomères protégés, à partir d'au moins un nucléotide ou

oligonucléotide fixé en surface du polymère conducteur électronique.

Les méthodes classiques de synthèse par voie chimique des acides nucléiques sont utilisables dans la mise en oeuvre de ce mode de réalisation.

Les supports conformes à l'Invention permettent en outre de réaliser l'élongation de l'oligonucléotide par voie électrochimique, en utilisant des variations de potentiel de l'électrode pour effectuer les réactions de protection, de déprotection et de condensation de la chaine polymérique en croissance.

La présente invention a également pour objet une électrode, caractérisée en ce que sa surface est constituée par un revêtement comprenant un copolymère de formule (I) conforme à l'Invention.

Une telle électrode peut être obtenue, par exemple, en déposant une couche d'un copolymère de formule (I) à la surface d'une électrode de platine, d'or, de chrome ou de titane recouvert d'or, ou de carbone vitreux, etc ...

Avantageusement, on peut associer plusieurs électrodes portant éventuellement des copolymères de nature différente. On obtient ainsi un dispositif utilisable pour la mise en oeuvre de réactions de synthèse, et/ou de réactions d'hybridation d'acides nucléiques.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux d'un dispositif conforme à l'Invention consiste à associer plusieurs électrodes dont deux au moins portent un groupe B_Z différent. Il peut s'agir par exemple d'un ensemble d'électrodes dont chacune porte un nucléotide (ou analogue) différent, ou d'un ensemble d'électrodes dont chacune porte un oligonucléotide de séquence différente.

Dans la mesure où il est possible de limiter les réactions électrochimiques aboutissant à la fixation

de l'oligonucléotide à une très petite surface, un dispositif conforme à l'invention peut être constitué par une pluralité de microsurfaces de PCE portées par des microélectrodes distribuées sur un support (microchip PCE). De la sorte, des oligonucléotides B_Z qui peuvent, si on le souhaite, être tous différents, peuvent être fixés de façon adressée et ordonnée sur ces microélectrodes.

Le "microchip PCE" est en particulier utilisable pour le séquençage des acides nucléiques et le diagnostic.

A titre d'exemple non limitatif illustrant ce qui précède, un copolymère [polypyrrole portant des oligonucléotides/polypyrrole] conforme à la présente invention, peut être obtenu :

1) Par réaction chimique d'un nucléoside, d'un nucléotide, d'un oligonucléotide, ou d'un de leurs analogues sur un polypyrrole fonctionnalisé. Par exemple, il est possible d'effectuer la condensation de l'aminoéthylpyrrole avec un oligonucléotide portant à une extrémité un phosphate libre ou un carboxyle activé.

2) Par copolymérisation chimique ou électrochimique du pyrrole avec le produit de condensation d'un nucléoside, d'un nucléotide, d'un oligonucléotide, ou d'un de leurs analogues avec le pyrrole. Par exemple on peut procéder à la copolymérisation électrochimique du pyrrole avec un oligonucléotide ayant un bras espaceur portant un pyrrole à son extrémité. L'épaisseur de la couche du copolymère obtenue sur une surface de platine à laquelle elle adhère fortement est de 0,1 µm à quelques µm, et elle peut être réalisée sur une surface de 100 μm^2 par exemple. Aucune réaction parasite de dégradation de l'oligonucléotide n'a pu être mise en évidence.

3) par préparation d'un polymère conducteur électronique portant des fonctions chimiques protégées. Ces fonctions sont déprotégées localement et sélectivement pour permettre leur couplage avec un

nucléoside, un nucléotide ou un oligonucléotide. Par exemple, il est possible de réaliser la préparation de monométhoxytrityl aminoéthyl pyrrole/polypyrrole, et de le déprotéger localement soit en milieu acide, soit en appliquant un potentiel. La fonction amine libérée peut ensuite réagir avec un nucléoside, un nucléotide ou un oligonucléotide portant par exemple un phosphate ou un carboxyle activés.

4) par synthèse simultanée dirigée spatialement de différents oligonucléotides.

La synthèse d'un oligonucléotide s'effectue en un point du support par assemblage de nucléotides protégés, à partir d'un nucléoside accessible en surface du copolymère. Les nucléotides protégés peuvent être des nucléosides phosphoramidites, des nucléosides phosphonates, des nucléosides phosphotriesters. Localement, la synthèse est effectuée à la manière dont est réalisée la synthèse d'un oligonucléotide sur support de silice dans un synthétiseur. Mais la différence est que la synthèse de tout l'ensemble des oligonucléotides est réalisée simultanément, en réalisant électrochimiquement des opérations de déprotection ou de condensation sélectives sur une très petite surface, ce qui permet de masquer les oligonucléotides qui ne doivent pas réagir. Ceci permet de réaliser en parallèle la synthèse de différents oligonucléotides.

Bien entendu, les procédés brièvement exposés ci dessus pour illustrer la synthèse de copolymères [pyrrole/oligonucléotides-pyrrole] sont également appliquables à des analogues polynucléotidiques, par exemple des analogues de la chaîne sucre-phosphate tels que mono- ou dithiophosphates, méthylphosphonates, phosphotriesters et des analogues non-ioniques non phosphorylés tels que formacétals, carbamates, sulfoxydes.

Les copolymères conformes à l'invention présentent une bonne stabilité aux contraintes mécaniques, à l'humididité, à la dessication, à la chaleur, aux bases, et sont donc compatibles avec un grand nombre de réactions, ce qui autorise une large variété d'utilisations.

Les inventeurs ont procédé à l'hybridation sélective d'oligonucléotides à des oligonucléotides complémentaires fixés sur support de polypyrrole, et ont constaté que l'utilisation de ce support confère les avantages suivants :

- Le copolymère conforme à l'invention est poreux, ce qui confère aux oligonucléotides fixés sur le support une bonne accessibilité pour l'hybridation avec des acides nucléiques de séquence complémentaire. Cette accessibilité est mise en évidence par l'observation d'une hybridation proportionnelle à l'épaisseur de la couche de copolymère. Un oligonucléotide complémentaire se trouvant dans le milieu d'hybridation s'hybride trois fois plus sur une couche de copolymère pyrrole/oligonucléotide-pyrrole trois fois plus épaisse (et donc renfermant trois fois plus d'oligonucléotide lié au support). La cinétique d'hybridation est voisine de celle qu'on observe avec les supports d'hybridation conventionnels. Il faut noter que dans les mêmes conditions, un oligonucléotide de séquence non complémentaire ne se fixe pas sur le support.

- Les Inventeurs ont également vérifié que l'hybridation est réversible et que tout oligonucléotide hybridé peut être relargué par chauffage, ou par traitement avec de la soude diluée, sans dommage pour le polypyrrole et l'oligonucléotide fixé.

- Comme il a été indiqué précédemment, une copolymérisation adressée est réalisable sur des surfaces d'électrodes extrêment petites. Ceci permet de réaliser une matrice de points miniaturisée parfaitement ordonnée

sur un support, chacun de ces points portant un oligonucléotide de nature parfaitement définie. Les chaînes nucléiques cibles portant une séquence complémentaire à la chaîne fixée sur le support s'hybrident sélectivement. Il en résulte une densité locale d'acides nucléiques cibles extrêment élevée, ce qui rend leur détection plus aisée, voire même dans certains cas supprime la nécessité d'une amplification préalable à la détection. La détection de l'hybridation peut en particulier être faite par le biais de l'électrode qui a servi à préparer le copolymère, et qui peut servir ensuite pour la mesure des phénomènes d'association ou de dissociation qui se produiront à sa surface. L'hybridation d'un acide nucléique complémentaire peut par exemple être suivie *in situ* par mesure électrique sur l'électrode qui supporte le polymère conducteur électronique, soit par mesure directe, soit en marquant l'oligonucléotide cible par une molécule électroactive telle qu'une phénothiazine ou une quinone par exemple.

Il va de soi que les méthodes traditionnelles de détection des séquences cibles d'acides nucléiques sont également applicables.

Les inventeurs ont en outre réussi à synthétiser des oligonucléotides directement sur le copolymère conforme à l'Invention par déprotection électrochimique in situ.

De manière générale, l'assemblage d'un nucléotide sur une chaîne polynucléotidique en croissance sur un support fait appel à une série de réactions qui mettent en jeu des groupements protecteurs pour diriger la réaction sur une fonction donnée et l'empêcher sur une autre. Les Inventeurs ont mis cette propriété à profit pour orienter la réaction d'assemblage sur les surfaces correspondant aux oligonucléotides choisis où l'on veut insérer un nucléotide.

Conformément à l'Invention, le groupement protecteur de la chaîne en croissance de l'oligonucléotide peut être éliminé localement par une réaction électrochimique, ce qui permet d'ajouter un nucléotide à l'emplacement choisi.

Des avantages complémentaires découlent de cette possibilité d'effectuer, sur le support conforme à l'invention, une synthèse oligonucléotidique in situ. En effet, dans ce cas, il est possible de synthétiser in situ et en parallèle l'ensemble des oligonucléotides qui vont être disposés sur la matrice de points, au lieu de synthétiser indépendamment des oligonucléotides portant un bras pyrrole, puis d'effectuer des copolymérisations successives. Ceci permet d'envisager la réalisation industrielle de matrices de plusieurs milliers de microsurfaces.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation de copolymères conformes à l'invention.

PREPARATION D'UN SUPPORT POLYPYRROLE PAR COPOLYMERISATION DE PYRROLE ET D'UN OLIGONUCLEOTIDE PORTANT UN GROUPE PYRROLE ; PROPRIETES DE CE SUPPORT

EXEMPLE N° 1 : SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES

I. - PREPARATION D'UN AMIDITE DE NUCLEOSIDE PYRROLE :

1ère METHODE

Le schéma réactionnel global de cette synthèse est illustré à la figure 1.

- Préparation du composé n° 1 (figure 1)

Ce composé peut être obtenu par réaction d'une diamine sur la diméthoxytrityl thiothymidine ou sur la diméthoxytrityl thiodésoxyuridine suivant les méthodes décrites par ROGET et al., [Nucleic Acids Res. 17, 7643-7651 (1989)].

- Préparation du composé n°2 (figure 1)

Le composé n°1 (2 g ; 3,1 mmoles) est séché par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre et redissous dans 20 ml de dichlorométhane. On ajoute 2 eq de dissuccinimidyl sébacoate (2,45 g ; 6,2 mmoles). La réaction est laissée 3 heures à température ambiante. Le produit obtenu est séparé sur colonne de silice (gradient de 0 à 10% de méthanol dans le chloroforme) ou précipité dans l'hexane (R = 60%). Il peut aussi être utilisé tel quel pour la synthèse du composé n° 3.

- Préparation du composé n° 3 (figure 1)

Ce produit est préparé par ajout de l'aminoéthylpyrrole (1,36 g ; 12,4 mmoles) au mélange réactionnel précédent ou de 220 mg d'aminoéthyl pyrrole (2 mmoles) au composé n° 2 obtenu après purification. Le pH est amené à 8-8,5 par ajout d'une amine tertiaire (triéthylamine). La réaction est laissée 2 heures et on ajoute 250 ml de chloroforme. La solution organique obtenue est lavée par 2 fois 100 ml de NaHCO3 0,5 M, et 100 ml d'eau distillée, puis séchée sur sulfate de sodium. Le produit est séparé sur colonne de silice avec du méthanol dans le chloroforme (0 à 10%). Après évaporation du solvant, le composé n° 3 est repris par 10 ml d'éthanol et précipité dans 400 ml d'éther éthylique (R = 60%).

- Préparation du composé n° 4 (figure 1)

Le composé n°3 (100 mg ; 0,11 mmoles) et du tétrazolate de diisopropylammonium (9 mg ; 0,5 eq) sont séchés par coévaporation dans un mélange de dichlorométhane (2 ml) et d'acétonitrile (3 ml) anhydres. Le résidu est repris par 2,5 ml de dichlorométhane stabilisé à l'amylène. De la bis-diisopropylaminocyano-éthoxyphosphine (39 µl ; 1,2 eq) est ajoutée à travers un septum. Au bout de 2 heures de réaction, on ajoute 20 ml de dichlorométhane anhydre. La solution obtenue est lavée 2 fois par 25 ml de NaHCO3 saturé puis 25 ml d'eau

distillée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le phosphoramidite obtenu est repris par 2 ml de dichlorométhane, précipité dans 100 ml d'hexane et séché une nuit au dessicateur. Le composé n°4 est obtenu avec un rendement de 85%. Il est conservé sous argon à -20°C à l'abri de l'humidité.

2° METHODE :

Les étapes de ce procédé sont illustrées à la figure 2.

MODE OPERATOIRE :

Préparation du composé n° 18 (figure 2)

Ce composé peut être préparé par réaction d'une diamine sur la diméthoxytrityl thiothymidine ou sur la diméthoxytrityl thiodésoxyuridine suivant les méthodes décrites par ROGET et al. [Nucleic Acids Res. ; 17, 7643-7651 (1989)].

Préparation du composé n° 19 (figure 2)

Le composé n° 18 (4 g ; 6.60 mmoles) est séché par coévaporation dans la pyridine anhydre et redissous dans 4 ml de pyridine anhydre et 40 ml de THF (tétrahydrofurane) anhydre.

On ajoute 1.2 eq d'anhydride succinique (800 mg ; 8 mmoles), et on laisse réagir pendant 1 h. On évapore les solvants puis, afin d'éliminer la pyridine, on coévapore au toluène. On ajoute 1.5 eq d'aminoéthyl pyrrole (1,1 ml ; 9,9 mmoles). On coévapore au THF. On ajoute 30 ml de THF et 2 eq de DCC (dicyclohexylcarbodiimide) (2,70 g ; 13.2 mmole) préalablement dissoute dans 30ml de THF. On laisse la réaction la nuit. Le précipité est éliminé par filtration et lavé par du dichlorométhane jusqu'à ce qu'il soit blanc. Le filtrat est évaporé à sec et repris par 250 ml de dichlorométhane. La solution organique obtenue est lavée par 2 x 250 ml de $NaHCO_3$ saturé puis 250 ml d'eau distillée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le produit (composé n° 19) est

purifié par chromatographie sur colonne de silice. Il est élué par CH_2CL_2/MeOH/TEA : 97,5/2,5/1. R = 67 %.

Préparation du composé n° 20 (figure 2)

Le composé n° 19 (600 mg ; 0.75 mmoles), et du tétrazolate de diisopropylammonium (63 mg ; 0.37 mmoles) sont séchés par coévaporation dans du dichlorométhane/acétonitrile : 2,5 ml/2,5 ml, puis repris par 5 ml de dichlorométhane. La bis-diisopropylamino-cyanoéthoxyphosphine (280 µl ; 0.9 mmoles) est ajoutée à travers un septum. Au bout de 2 heures de réaction on ajoute 20 ml de dichlorométhane. La solution organique obtenue est lavée par 2 x 25 ml de $NaHCO_3$ saturé puis 25 ml de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. Le résidu de l'évaporation est repris par 5 ml de dichlorométhane. Le produit (composé n° 20) est obtenu par précipitation dans l'hexane, avec un rendement de 78 %. Après séchage une nuit dans un dessicateur sous vide, il est conservé sous argon à -20°C à l'abri de l'humidité.

II. - <u>PREPARATION D'UN NUCLEOSIDE PYRROLE</u>

- <u>Préparation du composé n° 5</u>

Le composé n°4 (68 mg ; 0,06 mmoles) est redissous dans 300 µl d'acétonitrile anhydre (solution 0,2 M). Ce produit est utilisé pour préparer un oligonucléotide (Oligo-1-pyr) de séquence Pyr-TGT ACC TGA ATC GTC CGC CAT, dans laquelle Pyr représente le dérivé de nucléotide correspondant au composé n°4. La préparation de cet oligonucléotide est réalisée sur un synthétiseur automatique d'ADN (Applied Biosystems 381A) suivant les procédures décrites par le fabricant. Le composé n° 4 de l'invention est soumis au même cycle de synthèse que les phosphoramidites normaux (A C G T). Seuls la concentration (0,2 M au lieu de 0,1 M) et le temps de réaction (30 secondes au lieu de 15 secondes) sont augmentés pour le composé n° 4.

Après synthèse, l'oligonucléotide-pyrrole est détritylé sur le support, par action de TCA (acide trichloracétique) à 3%. Il est coupé du support par 4 x 500 µl de NH_4OH à 28%. Le chauffage de cette solution pendant 16 heures à 60°C permet d'éliminer les groupements protecteurs. Le composé n°5 (représenté figure 3) est obtenu par chromatographie en phase inverse en utilisant un gradient de 10 à 50% d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium (25 mM, pH 7).

Le composé n° 20 peut être utilisé de la même façon que le composé n° 4.

EXEMPLE 2 : PREPARATION DU SUPPORT PCE-POLYNUCLEOTIDE PAR COPOLYMERISATION ELECTRONIQUE (composé n° 6, figure 3)

A - Principe de la technique

Les noyaux pyrroles oxydés sont capables de se polymériser pour former un polymère insoluble, le polypyrrole. Une cellule d'électropolymérisation est schématisée à la figure 4a : cette cellule comprend une électrode de travail (1), une contre-électrode (2), et une électrode de référence (3).

Si l'oxydation est réalisée par voie électrochimique, la synthèse du polypyrrole n'aura lieu que sur l'électrode de travail. Ceci permet donc une synthèse très localisée d'un polymère. Un oligonucléotide portant au bout d'un bras un noyau pyrrole peut donc être inséré dans le polymère simplement par copolymérisation des pyrroles. On obtient ainsi le polymère désiré (composé 6, figure 3).

Le polymère formé (polypyrrole) étant conducteur, ces réactions peuvent être poursuivies et plusieurs cycles de synthèse peuvent être réalisés (il y a seulement une variation de résistance de l'électrode à chaque cycle).

B - Méthode

La polymérisation est conduite sur une électrode de platine de 60 mm^2 dans une solution contenant

10^{-2} M de pyrrole, 5.10^{-7} M de pyrrole substitué, oligonucléotide porteur d'un groupe pyrrole en 5' (Oligo-1-pyr) et 0,1 M de $LiClO_4$ (dopant).

L'oligonucléotide portant le pyrrole en 5' (composé n° 5, Oligo-1-pyr) a été synthétisé selon la méthode décrite ci-dessus à l'exemple 1, et purifié par HPLC sur phase inverse. Un oligonucléotide de même séquence (Oligo-1) ne portant pas de pyrrole a servi de contrôle négatif.

Ces deux produits ont été marqués en 5' par du ^{32}P afin de suivre plus facilement les réactions de copolymérisation.

Les réactions d'oxydation du monomère et de réduction du polymère sont assurées par une variation cyclique du potentiel entre -0,4 et +0,9 V/ECS. La figure 4b représente les courbes de voltampérométrie cyclique (intensité en fonction du potentiel) au cours de 12 cycles de polymérisation.

L'intégration du courant par rapport au temps (quantité d'électrons consommée) permet une évaluation de la masse de polymère formé sur la surface de l'électrode et donc de l'épaisseur du film (de l'ordre de 0,2 µm pour 5.10^{-2}C).

C - Résultats

* <u>Stabilité d'un oligonucléotide dans les conditions d'électropolymérisation.</u>

Le contrôle par HPLC de l'oligonucléotide en solution soumis à l'électropolymérisation ne montre aucune dégradation de celui-ci.

* <u>Migration propre d'un oligonucléotide soumis à un potentiel.</u>

Un acide nucléique est une molécule polyanionique capable de migrer dans un champ électrique mais, de par la présence des ions perchlorate dans le milieu, aucune migration n'est observée. D'autre part, aucune ad-

sorption des oligonucléotides sur un polypyrrole préformé n'est mesurable.

* Spécificité et du taux d'incorporation des oligonucléotides lors de la copolymérisation.

1 - La polymérisation du pyrrole est conduite en présence de l'oligonucléotide 1 non modifié oligo-1 (TGT ACC TGA ATC GTC CGC CAT).

Oligo-1 : 10^{-9} M dans le milieu réactionnel

Oligo-1 sur support : 4.10^{-12} mol, soit 0,4% d'incorporation non spécifique.

2 - La polymérisation est conduite en présence de l'oligonucléotide modifié Oligo-1-pyr (P TGT ACC TGA ATC GTC CGC CAT)

Oligo-1-pyr : 10^{-9} M dans le milieu réactionnel

Oligo-1-pyr sur support : $7,2.10^{-12}$ mol, soit 0,72% d'incorporation.

44% des oligonucléotides-pyrroles détectés sur le support sont effectivement fixés par le groupe pyrrole. Cependant, en ajoutant 0,2 M de thymidine 5' phosphate dans la solution d'électropolymérisation, la spécificité d'accrochage s'élève alors à 80%, par diminution de la fixation de l'oligonucléotide non modifié.

* Réactivité électrochimique de l'oligonucléotide-pyrrole.

La solution de départ contient 1 oligonucléotide-pyrrole pour 20 000 monomères pyrrole. Par le calcul de la masse du polymère formé et par la quantité d'oligonucléotide fixé, on estime que le polymère comprend 1 oligonucléotide-pyrrole pour 60 000 maillons pyrrole.

L'oligonucléotide-pyrrole s'incorpore donc 3 fois moins qu'un pyrrole libre, ce qui constitue un taux d'incorporation tout-à-fait satisfaisant.

* Densité de fixation.

Dans les conditions expérimentales exposées ci-dessus, 5,3 pmoles/cm2 d'oligonucléotides sont fixées.

La proportion d'oligonucléotide intégré dans le polymère (1/60 000) peut être facilement améliorée par augmentation du rapport [oligonucléotide-pyrrole/pyrrole monomère] dans le milieu réactionnel. Ceci peut être réalisé de trois différentes façons

- Augmentation de la quantité d'oligonucléotide ;
- Diminution de la concentration de pyrrole libre ;
- Diminution du volume réactionnel.

EXEMPLE 3 : PROPRIETES DES COPOLYMERES OLIGONUCLEOTIDES-POLYPYRROLE CONFORMES A L'INVENTION : UTILISATION COMME SUPPORT D'HYBRIDATION D'ACIDES NUCLEIQUES.

Un support polypyrrole portant l'oligonucléotide Oligo-1 a été synthétisé selon la méthode décrite à l'exemple 2. L'électropolymérisation a été conduite jusqu'aux charges de 5.10^{-2} C pour obtenir un support de 0,2 µm d'épaisseur, et de 15.10^{-2} C pour obtenir un support de 0,6 µm d'épaisseur. Les réactions d'hybridation sont effectuées dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, SDS 0,5%. Les lavages sont réalisés dans le même tampon mais dilué 4 fois. Toutes ces réactions sont effectuées à température ambiante.

Résultats

L'accessibilité des oligonucléotides greffés a été vérifiée par leur capacité d'hybridation avec d'un oligonucléotide complémentaire marqué au ^{32}P se trouvant dans le milieu liquide environnant.

a) Hybridation

La cinétique d'hybridation des supports de différentes épaisseurs est comparable, et la capacité totale d'hybridation est proportionnelle à l'épaisseur du support, comme le montre la figure 5, qui représente en

abscisse le temps d'hybridation (en minutes), et en ordonnée la quantité d'oligonucléotide complémentaire marqué au ^{32}P fixé au support (en cpm), pour deux épaisseurs différentes : (●) = support de 0,2 µm d'épaisseur ; (▲) = support de 0,6 µm d'épaisseur.

b) Dénaturation

Il est possible de suivre la dénaturation des duplex de façon continue, ce qui montre la réversibilité du phénomène d'hybridation. Les figures 6a) et 6b) illustrent respectivement la quantité d'oligonucléotides restant sur l'électrode et la vitesse de dénaturation en fonction de la température de lavage (pour une variation de température de 1°C par minute) sur les supports d'épaisseur différente : (●) : 0,2 µm ; (▲) = 0,6 µm.

D'autre part, il a été vérifié que le support oligonucléotide-polypyrrole n'est pas affecté par des cycles de dénaturation/renaturation.

Dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, la vitesse maximale de dénaturation est atteinte à 60°C environ, ce qui correspond au point de fusion théorique de l'oligonucléotide (61,5°C).

EXEMPLE N° 4 : SYNTHESE IN SITU D'OLIGONUCLEOTIDES SUR SUPPORT POLYPYRROLE

I. - FIXATION DU 1er NUCLEOTIDE

1ère METHODE

Préparation du composé n° 13

Le schéma réactionnel est illustré par la figure 7.

Le support (composé n°8, figure 7) est réalisé par électropolymérisation d'une solution de pyrrole et d'aminoéthylpyrrole (10^{-2} M/10^{-3} M) en présence de $LiClO_4$ 0,1 M dans l'acétonitrile. L'électropolymérisation se fait par balayage de -0,3 V à +0,85 V par rapport à Ag/Ag+ 10^{-2} M sur une électrode de platine de 60 mm^2.

- Préparation du composé n° 11 (figure 7)

Le composé n°8 est lavé par de l'acétonitrile anhydre (2 x 5 ml) puis par de la triéthylamine dans l'acétonitrile (500 µl / 5 ml).

10 mg de nucléoside activé (composé n° 2) sont séchés par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre, repris par 500 µl d'acétonitrile anhydre et ajoutés au support dans un flacon hermétiquement bouché. L'ensemble est placé sous agitation mécanique douce pendant 24 heures. Le support est retiré et lavé par de l'acétonitrile puis du dichlorométhane jusqu'à disparition de la couleur du trityle dans les solvants de lavage.

Les fonctions amine du support n'ayant pas réagi avec le nucléoside doivent être bloquées. Ceci a été effectué par "capping" par un mélange d'anhydride acétique-N-méthylimidazole dans la pyridine. La réaction est laissée 6 heures. Le support fonctionnalisé (composé n° 11) est ensuite lavé intensivement par 3 x 10ml de pyridine, 3 x 10ml d'acétonitrile et 3 x 10ml de dichlorométhane successivement.

2ème METHODE

Le schéma réactionnel est illustré à la figure 8.

- Préparation du composé n° 14 (figure 8)

Le polypyrrole aminé (composé n° 8) est lavé par de l'acétonitrile anhydre (2 x 5 ml) puis par de la triéthylamine dans l'acétonitrile (500 µl/5 ml). Le nucléoside activé (composé n° 2) (20 mg) est séché par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre, repris par 1 ml d'acétonitrile anhydre et ajouté au support (composé n°8) dans un flacon hermétiquement bouché. L'ensemble est placé sous agitation mécanique douce pendant 24 heures. Le support greffé (composé n° 14) est lavé par de l'acétonitrile puis du dichlorométhane jusqu'à dispari-

tion de la couleur du trityle dans les solvants de lavage lors de leur acidification.

- Préparation du composé n° 15 (figure 8)

Les fonctions alcool secondaire apportées par le nucléoside ainsi que les fonctions amine du support n'ayant pas réagi doivent être masquées. Pour cela, on réalise un blocage par un mélange d'anhydride acétique/N-méthylimidazole dans la pyridine (1 ml) pendant 6 heures. Un lavage par de la pyridine (2 x 5 ml), de l'acétronitrile (2 x 5 ml) et du dichlorométhane (2 x 5 ml) permet d'obtenir le composé n° 15.

II. - ELONGATION DE L'OLIGONUCLEOTIDE

- Préparation du composé n° 12 (figure 7)

- Le trimère d(CCT) a été préparé sur électrode de platine recouverte de polypyrrole par deux méthodes :

. Synthèse avec déprotection chimique, suivant le cycle habituel de la synthèse phosphoramidite,

. Synthèse avec détritylation électrochimique.

a) Synthèse chimique

On effectue, autant de fois que nécessaire, les étapes suivantes, chacune correspondant à la fixation d'un nucléotide ; ces étapes sont représentées à la figure 9 :

- Détritylation du support par 4 x 500 µl d'acide trichloroacétique à 2% dans le dichlorométhane ;
- Rinçage par de l'acétonitrile pour enlever le réactif (5 x 1 ml) ;
- Lavage par de l'acétonitrile anhydre pour synthèse d'ADN (3 x 1 ml) ;
- Ajout de 250 µl de phosphoramidite 0,1 M et 250 µl de tétrazole 0,5 M ;
- Couplage (2 mn) et élimination de la solution nucléosidique ;
- Rinçage par de l'acétonitrile (5 x 1 ml) ;

- Capping anhydride acétique/méthylimidazole (500 µl, 1mn) ;
- Rinçage par de l'acétonitrile (2 x 1 ml) ;
- Oxydation par iode/lutidine 1 mn (500 µl, 1 mn) ;
- Rinçage par 5 x 1 ml d'acétonitrile ;
- Détritylation, et début d'un nouveau cycle, etc ...

La mesure des trityles donne respectivement à l'issue de chaque cycle : 0,090 DO/2 ml (dT), 0,095 DO/2 ml (dCT) et 0,087 DO/2 ml (dCCT).

b) Synthèse avec déprotection électrochimique

Les étapes de synthèse sont les mêmes que pour la synthèse chimique ci-dessus, mais la détritylation est réalisée par application d'un potentiel de 1,2 V pendant 5 mn.

La détritylation n'est pas quantifiable, car le cation trityle formé est capté par l'anode, ce qui le soustrait à la mesure. Le cycle de couplage a cependant été réalisé.

- Préparation du composé n° 13 (figure 7)

La coupure du support et l'élimination des groupements protecteurs sont faites par 2 ml d'ammoniaque dans un tube en verre fermé par un bouchon à vis la réaction est effectuée pendant 48 heures à température ambiante.

Les témoins préparés sur colonne de silice sont déprotégés par 4 x 250 µl d'ammoniaque pour les décrocher du support (t = 4 x 1/2 h). La solution ammoniacale est ensuite laissée 48 heures à température ambiante. Les solutions sont évaporées et analysées par chromatographie en phase inverse sur une colonne C4, 5 µm de 25 cm. On applique un gradient de 0 à 30% de B (Acétate de triéthylammonium 25 mM, pH 7 et acétonitrile 50%) dans A (Acétate de triéthylammonium 25 mM, pH 7) en 30 min.

- Préparation du composé n° 16 (figure 10)

Le composé n° 16 est synthétisé suivant le même protocole que le composé n° 12 avec des résultats semblables pour la détritylation. Ceci montre que la nature du bras espaceur influe peu sur la synthèse chimique.

- Préparation du composé n° 17 (figure 10)

Le composé n° 16 est déprotégé 48 heures à température ambiante dans l'ammoniaque à 28% dans un flacon hermétiquement bouché. Le groupement diméthoxytrityle est ensuite coupé par l'acide trichloroacétique à 3% (3 x 3 ml) et mesuré pour vérifier que l'oligonucléotide est toujours sur le support.

EXEMPLE N° 5 : COPOLYMERISATION D'OLIGONUCLEOTIDES-PYRROLE SUR DES MICROELECTRODES

Une matrice de quatre électrodes représentée à la figure 11a est réalisée par inclusion de quatre fils de platine (1) (diamètre 0,6 mm) dans un cylindre de verre (2) (diamètre 5 mm x 10 mm de hauteur). Une des électrodes est utilisée comme contre-électrode (3). Ce système de matrice permet de fixer des oligonucléotides différents sur chaque point de la matrice.

La matrice d'électrodes est plongée dans un récipient (4), où est effectuée la réaction, et où est également immergée une électrode de référence (5).

Les 3 électrodes de travail sont successivement recouvertes électrochimiquement par un copolymère composé de pyrrole et d'oligonucléotides capables de détecter par hybridation une mutation du codon 61 du gène ras H humain. Ces 3 oligonucléotides portant en 5' un groupe pyrrole sont les suivants :

- oligo normal : 5' Pyr TCCTCCTGGCCGG 3'
- oligo muté A : 5' Pyr TCCTCCAGGCCGG 3'
- oligo muté C : 5' Pyr TCCTCCCGGCCGG 3'

Chaque oligonucléotide est copolymérisé successivement sur chaque électrode dans les conditions

décrites dans l'exemple 2, mais dans un volume réactionnel de 300 µl au lieu de 3 ml.

Les voltampérogrammes obtenus sont représentés sur la figure 11b : ((1) polymérisation sur la première électrode ; (2) polymérisation sur la deuxième électrode ; (3) polymérisation sur la troisième électrode) Ces voltampérogrammes sont très réguliers et très reproductibles aussi bien à charge réduite (2 à 4.10^{-4} C, courbes du haut) qu'à forte charge (1 à $1,3.10^{-3}$ C, courbes du bas). Dans ces conditions, 6.10^{-14} moles d'oligonucléotide sont fixées sur 0,3 mm^2 (soit 18 pmoles/cm^2) pour une épaisseur de film de 0,1 µm (charge de 10^{-4} C).

- Détection d'une mutation ponctuelle d'un acide nucléique par hybridation sur une matrice 3 points.

Trois fragments d'acide nucléique d'une longueur de 51 nucléotides sont utilisés afin de simuler les mutations ras H naturelles recherchées.

Ces trois acides nucléiques ont pour séquence :

- ras H normal :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

- ras H muté T :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCTGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

- ras H muté G :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCGGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

Ils sont spécifiquement reconnus par hybridation avec les sondes fixées sur la matrice ; respectivement oligo normal, oligo muté A, oligo muté C.

La réaction d'hybridation est réalisée à 25°C durant 1 heure, dans un tampon phosphate 20 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, SDS 0,5% contenant 0,1 pmole d'acide nucléique à détecter, marqué en 5' par du 32P. La matrice est ensuite lavée dans le même tampon à 35°C. La détection est réalisée par autoradiographie de la matrice sur un film photo. Dans ces conditions, l'hybridation de

l'acide nucléique cible n'a lieu que sur l'électrode portant l'oligonucléotide de séquence strictement complémentaire ; aucune hybridation croisée n'est décelable.

La détection spécifique d'une mutation ponctuelle est donc possible grâce à cette matrice.

EXEMPLE 6 : UTILISATION D'ULTRA-MICROELECTRODES.

Un système représenté à la figure 12 est composé de 10 électrodes d'or déposées sur une plaquette de verre ; la largeur des électrodes peut varier de 10 à 100 µm et la longueur de la zone active (zone plongée dans la solution) est de l'ordre de 2 mm. Un autre système a été fabriqué par dépôt sélectif d'or sur un substrat isolant d'oxyde de silicium, puis isolation des connexions. Des matrices constituées d'électrodes carrées de 25 à 200 µm de côté sont ainsi obtenues.

Dans les deux cas, la copolymérisation de pyrrole et d'oligonucléotide-pyrrole peut être effectuée sur chaque électrode, selon le procédé décrit dans l'exemple 5 et les films de polypyrrole obtenus sont de bonne qualité et leur épaisseur peut être parfaitement maitrisée, comme décrit à l'exemple 2.

EXEMPLE 7 : SYNTHESE IN SITU D'OLIGONUCLEOTIDES : DEPROTECTION ELECTROCHIMIQUE DE 5'-TTCTGAGG-3'

La synthèse a été conduite sur un support de polypyrrole aminé (composé n° 8), portant un bras clivable pour les besoins de l'analyse ultérieure de l'oligonucléotide formé.

MODE OPERATOIRE :

- Synthèse de 5'-TTCTGAGG-3' avec une étape de déprotection électrochimique de 5'-TTCTGAGG-3'

L'amidite de thymidine introduit en position (5) à partir de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide est déprotégé par application d'un potentiel de +1,1 V pendant 15 mn lorsque le groupement protecteur est le thiopixyle, ou de -1,3 V pendant 15 mn lorsque le

groupement protecteur est le groupement p-nitro-benzoyle. Les autres nucléosides sont introduits sous forme d'amidites tritylés, et sont déprotégés chimiquement, par détritylation par l'acide trichloroacétique.

1) **Protection par un groupement p-nitro-benzoyle** :

Les étapes de préparation du nucléoside protégé sont illustrées par la figure 13.

- Synthèse de la p-nitrobenzoylthymidine (composé n° 21 : figure 13)

La thymidine (2,42 g ; 10 mmoles) est séchée par coévaporation dans la pyridine, puis reprise par 200 ml de pyridine anhydre et refroidie à 4°C. On ajoute le chlorure de p-nitrobenzoyle (2,04 g ; 11 mmoles). On laisse remonter la température et on laisse la réaction la nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée par 5 ml de bicarbonate de sodium saturé. Le mélange réactionnel est concentré puis repris par 500 ml de chloroforme. La solution organique obtenue est lavée par 2 x 500 ml de $NaHCO_3$ 0,5 M puis 250 ml de NaCl saturé. Les phases aqueuses sont contre-extraites par 100 ml de $CHCl_3$. Les phases organiques sont évaporées. Le produit pur est obtenu par chromatographie sur colonne de silice. Il est élué par 5 % de méthanol dans le chloroforme. R = 58 %.

- Synthèse de l'amidite de la p-nitrobenzoylthymidine (composé n° 22 : figure 13)

Le composé n° 21 (1.96 g ; 5 mmoles) et le tétrazolate de diisopropylammonium (428 mg ; 2.5 mmole) sont séchés par coévaporation à partir d'un solvant dichlorométhane/acétonitrile anhydre. Ces réactifs sont repris par 25 ml de dichlorométhane anhydre et on ajoute la bis-diisopropylaminocyanoéthoxyphosphine (1.8 g ; 6 mmoles). Après 2 h de réaction (à l'abri de l'oxygène et de l'humidité) le mélange réactionnel est dilué par 250 ml de dichlorométhane et lavé successivement par 2 X 250

ml de bicarbonate de sodium 0,5 M et 250 ml de chlorure de sodium saturé. La phase organique est évaporée. Le résidu est repris par 10 ml de dichlorométhane. Le produit (composé n° 22) est obtenu par précipitation dans l'hexane, puis séché sous vide et stocké sous argon. R = 84 %.

2) <u>Protection par un groupement thiopixyle</u>

Les étapes de préparation du nucléoside protégé sont illustrées par la figure 14.

- Synthèse de la thiopixylthymidine (composé n° 23 : figure 14)

La thymidine (2.42 g ; 10 mmoles) est séchée par coévaporation dans la pyridine, reprise par 100 ml de pyridine anhydre, refroidie à 4°C, et mise en réaction avec le chlorure de thiopixyle (3.4 g ; 11 mmoles). Après remontée progressive de la température jusqu'à la température ambiante, on laisse la réaction s'effectuée penant une nuit (8 à 12 environ) . La réaction est stoppée par 10 ml de $NaHCO_3$. Le solvant est évaporé, et le résidu est repris par 250 ml de dichlorométhane. La solution organique obtenue est extraite par 2 x 250 ml de $NaHCO_3$ saturé puis par 250 ml d'eau distillée. Les phases aqueuses sont contre-extraites par 100 ml de chloroforme. La phase organique est évaporée. Le produit est purifié sur colonne de silice avec 0,5 % de TEA (triéthylamine) dans les solvants. Il est enfin élué par 5 % de méthanol dans le dichlorométhane (+ 0,5 % TEA). R = 52%.

- Synthèse de l'amidite de la thiopixylthymidine (composé n° 24, figure 14)

Le composé n° 24 est préparé à partir du composé n° 23 (5 mmoles) suivant le même mode opératoire que le composé n° 22. R = 78 %.

3) <u>Fixation du premier nucléoside</u>

Les étapes de cette fixation sont illustrées à la figure 15.

La synthèse de cet oligonucléotide se fait sur un ruban de platine (3 x 10 mm) sur lequel on a copolymérisé un mélange de pyrrole et d'aminoéthyl pyrrole (9:1).

Le premier nucléoside (position 1- extrémité 3') est couplé sur l'amino éthyl pyrrole (composé n° 8) suivant les méthodes décrites pour la fonctionnalisation des supports de silice [K. MIYOSHI et al, Nucleic Acids Res. ; 8, (22), 5473-5489 (1989)], à partir d'un ester activé N-isobutyryl 2'-désoxyguanosine (composé n° 25 : (figure 13a).

Le composé n° 26 (10 mg) est dissous dans 500 µl d'acétonitrile. On ajoute l'électrode de platine recouverte de polypyrrole fonctionnalisé, et 1 µl de triéthylamine. La réaction est agitée mécaniquement 20 heures à température ambiante. L'électrode greffée (composé n° 26) est retirée, et lavée abondamment par de l'acétonitrile puis par du dichlorométhane.

Les fonctions amine n'ayant pas réagi sont bloquées à l'anhydride acétique (10 % dans 500 µl de pyridine) pendant 6 heures. L'électrode greffée est lavée à la pyridine et au méthanol puis séchée.

4) <u>Synthèse de l'oligonucléotide dTTCTGAGG</u>

L'électrode greffée est placée dans une colonne OPC® vidée (APPLIED BIOSYSTEMS). Le remplissage est terminé par des copeaux de téflon afin de minimiser le volume résiduel. Les nucléosides en position 2, 3, et 4 sont ajoutés suivant les prescriptions du fabricant (APPLIED BIOSYSTEMS) pour le "cycle 1 µmole" sur le synthétiseur 381A. La déprotection chimique du groupe diméthoxytrityle entre chaque étape est réalisée par le TCA dans le dichlorométhane dans les conditions recommandées par le fabricant.

L'amidite en position 5 (composé n° 22 ou composé n° 24) est couplé suivant la même méthode que les amidites normaux avec un temps de couplage de 1 mn. On

procède à l'oxydation de la liaison phosphite triester créée, et au capping suivant le mode opératoire classique. L'électrode est sortie, de la colonne et on procède à la déprotection électrochimique.

Si on utilise le composé n° 22 le groupement p-nitrobenzoyle est coupé en plongeant l'électrode dans l'électrolyte suivant : tétrabutylammonium perchlorate 0,1 M dans le méthanol, et en appliquant un potentiel de -1,3 V pendant 15 mn.

Si on utilise le composé n° 24 le thiopixyle est coupé en appliquant un potentiel de +1,1 V pendant 15 mn, l'électrolyte étant du tétrabutylammonium perchlorate 0,1 M dans l'acétonitrile.

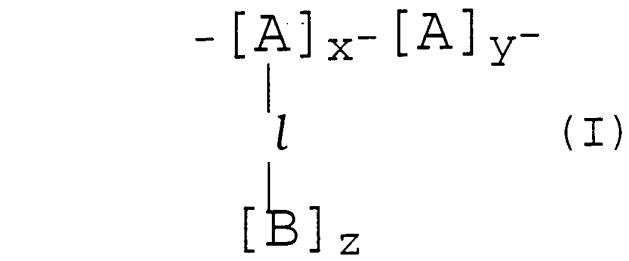
Dans les deux cas, après coupure du groupement protecteur du nucléosite T en position 5', l'électrode est replacée dans la colonne avec les copeaux de téflon, et la synthèse est poursuivie en ajoutant successivement les amidites C (position 6), T (position 7), T (position 8).

Quand la synthèse est terminée l'oligonucléotide est coupé du support : l'électrode est traitée par 4 x 500 µl d'ammoniaque à 28 % en flacon bouché pendant 4 x 1/2 h. Les 4 fractions sont regroupées dans un flacon WHEATON, de 4 ml bouché, et laissées 16 h à 55°C pour déprotéger l'oligonucléotide.

Après coévaporation en présence de TEA, un aliquot (1/100ème) de l'oligonucléotide obtenu est marqué en 5' par du 32P en présence de polynucléotide kinase puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide montre la présence du produit désiré (8 mère) ainsi que l'absence de l'oligonucléotide (5 mère) dont la présence indiquerait une mauvaise déprotection électrochimique de l'amidite de thymidine.

REVENDICATIONS

1) Copolymère, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, et l représente une liaison covalente, ou un bras espaceur.

2) Copolymère selon la revendication 1, caractérisé en ce que A représente une unité monomère d'un PCE choisi dans le groupe comprenant le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polypyrrole, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline.

3) Copolymère selon la revendication 2, caractérisé en ce que A est une unité pyrrole.

4) Copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport x/y est compris entre 1/5 et 1/100.000

5) Copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l représente un bras espaceur répondant à la formule suivante :

$$-R_1-[(CH_2)_n-R_2]_x-[CH_2)_m-R_3]_y-(CH_2)_p-$$

dans laquelle :

-n est un nombre entier de 1 à 10 ;

-m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

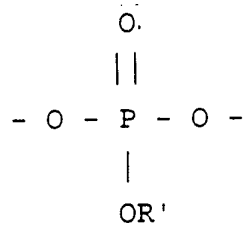
-p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

-x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

-y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

-R_1, R_2 et R_3 qui peuvent être identiques ou différents représentent :

CH2; O; S; NR'; CO; CH=CH ; NR'CO; CONR'; $NHSO_2$;



où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C_1 à C_{12}.

6) Procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une première étape, au cours de laquelle on procède à la préparation d'un copolymère de formule générale (II) :

$$- [A^*]_x - [A]_y - \qquad (II)$$

dans laquelle A, x et y sont tels que définis dans la revendication 1, et A^* représente A fonctionnalisé.

- une deuxième étape au cours de laquelle on procède à la fixation, sur le polymère de formule (II) d'au moins un groupe de formule générale (III) :

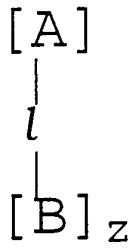
$$l^* - [B]_z \qquad (III)$$

dans laquelle B et z sont tels que définis précédemment et l^* est un bras activé capable de se lier à A^*.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de préparation du copolymère de formule générale (II) et/ou l'étape de fixation du groupe de formule générale (III) sont effectuées par réaction électrochimique.

8) Procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une étape a) au cours de laquelle on procède à la préparation du composé de formule générale (IV) :



(IV)

dans lequel A, B, z, et l sont tels que définis ci-dessus,

- une étape b) au cours de laquelle on procède à la copolymérisation du composé (IV) avec le monomère A.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape b), est effectuée par copolymérisation électrochimique du composé (IV) avec les monomères A.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que l'on procède en outre à l'élongation de B_z, en plusieurs étapes successives, chacune de ces étapes étant constituée par la fixation d'un ou plusieurs unités B.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'élongation de B_z fait intervenir une suite de réactions électrochimiques.

12) Procédé selon une quelconque des revendications 7, 9 ou 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre à la surface d'une électrode.

13) Utilisation d'un polymère conducteur électronique comme support pour la fixation par liaison covalente, d'au moins un nucléotide, ou d'au moins un oligonucléotide.

14) Utilisation d'un copolymère selon l'une quelconque des revendication 1 à 5 comme support de synthèse polynucléotidique.

15) Utilisation d'un copolymère selon l'une quelconque des revendication 1 à 5 comme support d'hybridation d'acides nucléiques.

16) Electrode, caractérisée en ce que sa surface est constituée par un revêtement comprenant un copolymère de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

17) Dispositif utilisable pour des réactions de synthèse et d'hybridation d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs électrodes selon la revendication 16, lesquelles électrodes peuvent être identiques ou différentes.

18) Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend plusieurs électrodes, dont au moins deux portent chacune un groupe Bz différent.

FIGURE 1

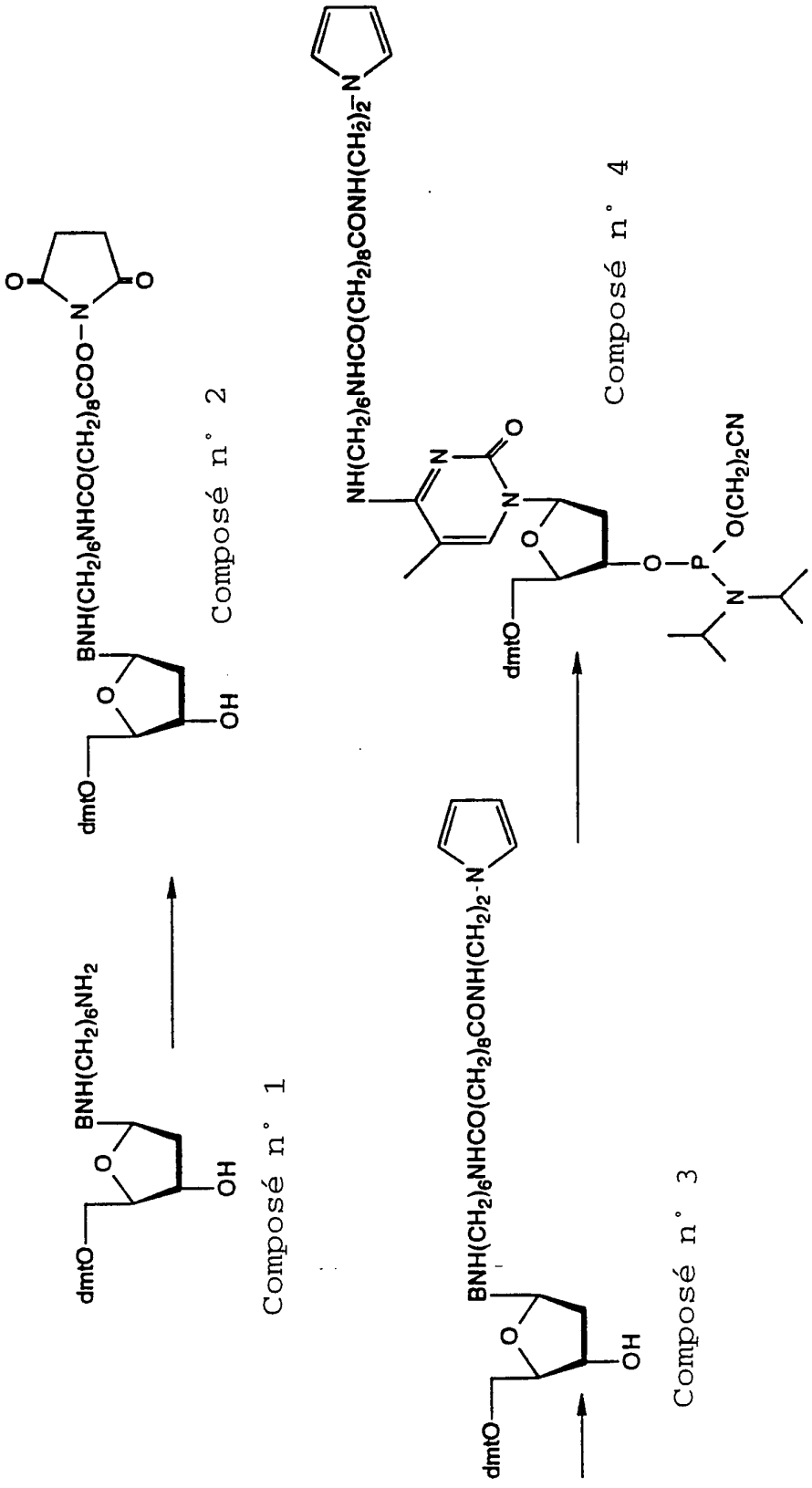

Composé n° 1
Composé n° 2
Composé n° 3
Composé n° 4
dmtO
OH
BNH(CH2)6NH2
BNH(CH2)6NHCO(CH2)8COO-N
BNH(CH2)6NHCO(CH2)8CONH(CH2)2-N
NH(CH2)6NHCO(CH2)8CONH(CH2)2-N
O(CH2)2CN
P
N

FIGURE 2

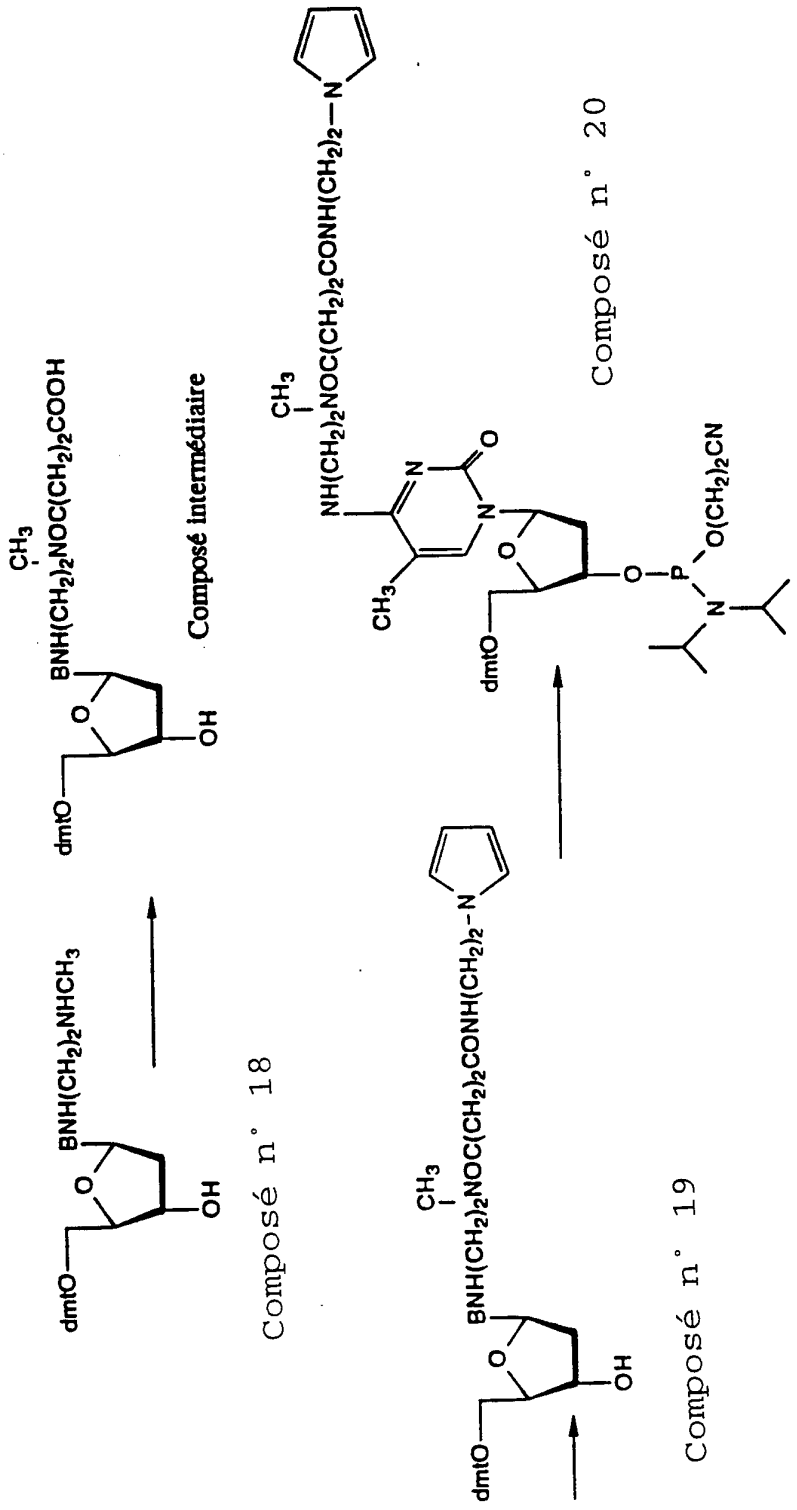

Composé intermédiaire
Composé n° 18
Composé n° 19
Composé n° 20
dmtO
OH
O
N
P
CN

FIGURE 3

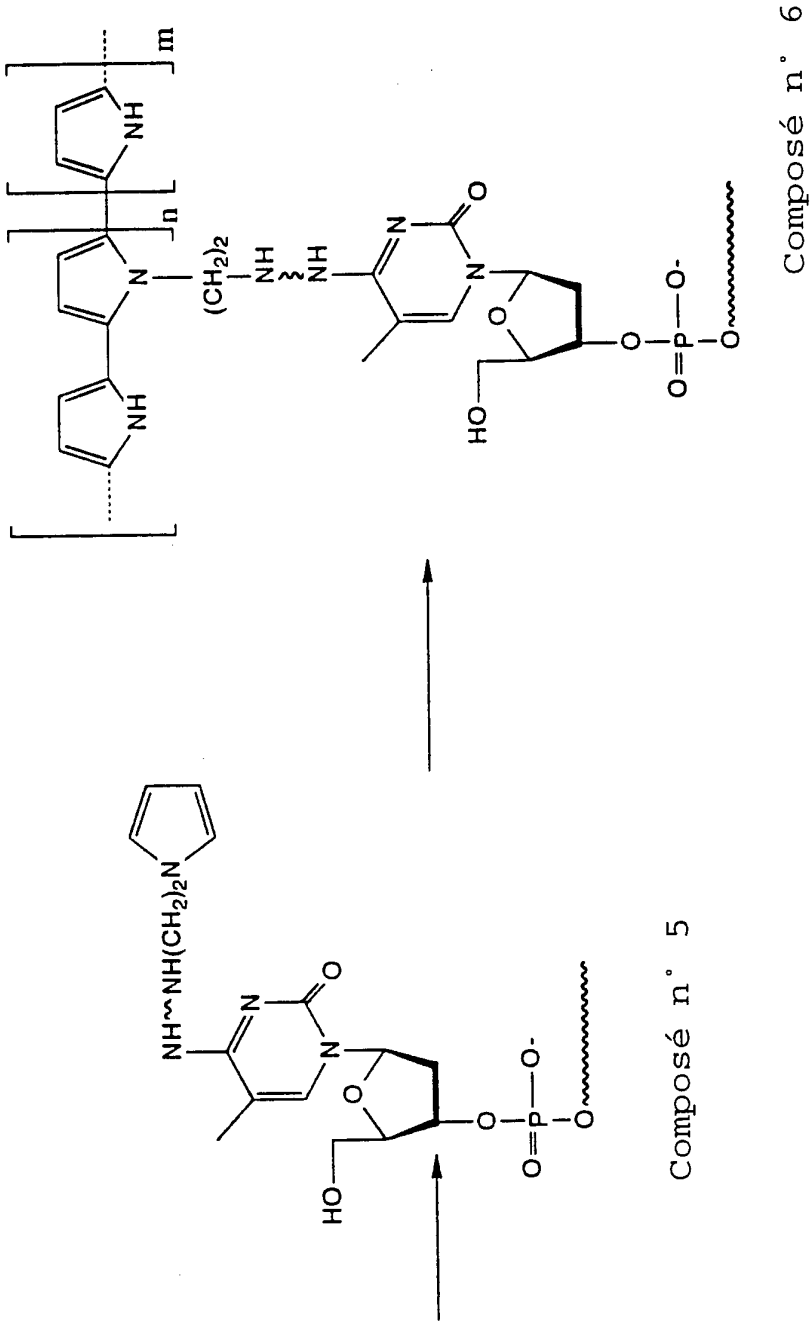


FIGURE 4

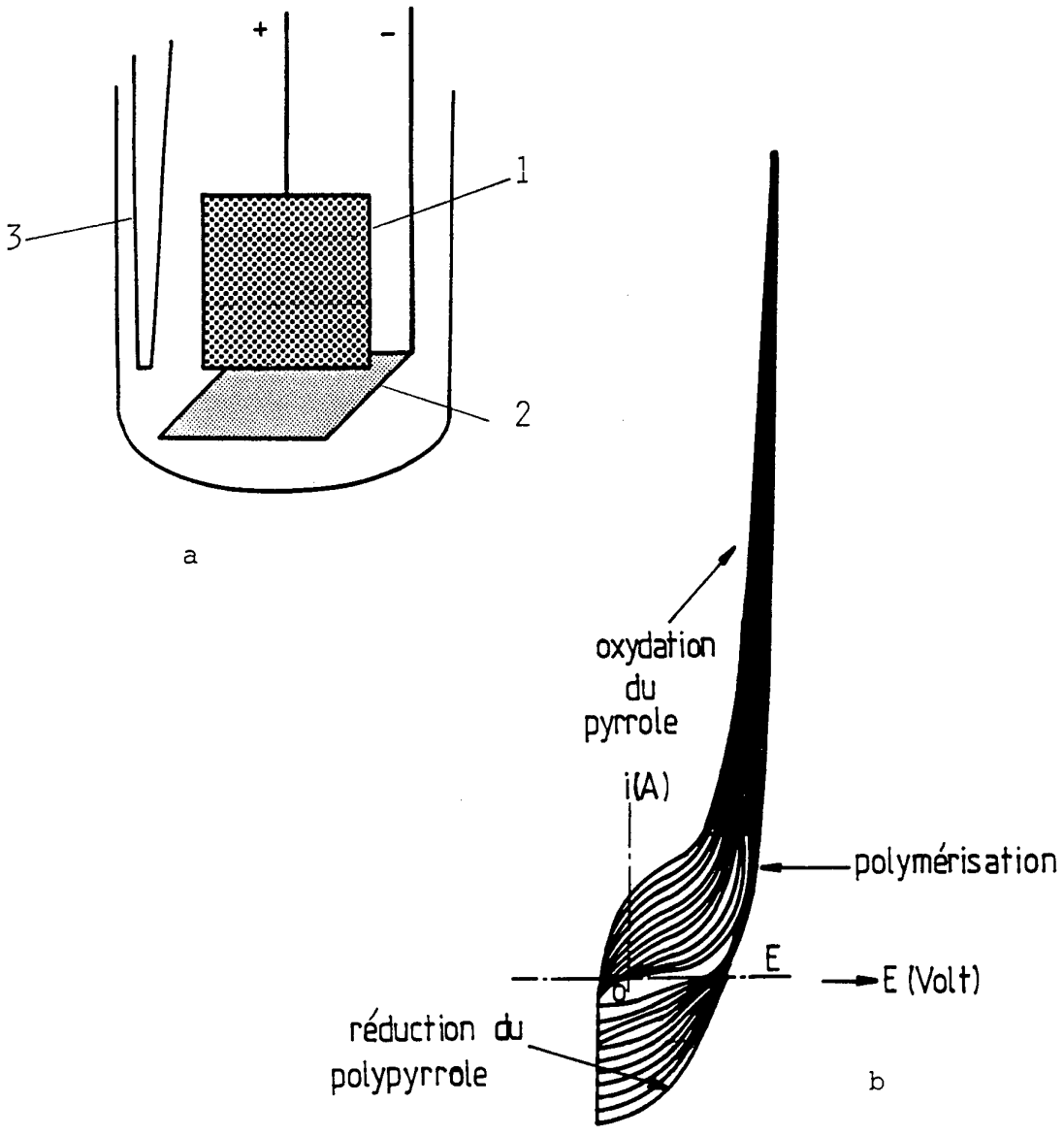

+
-
1
2
3
a
oxydation
du
pyrrole
i(A)
polymérisation
E
E (Volt)
réduction du
polypyrrole
b

FIGURE 5

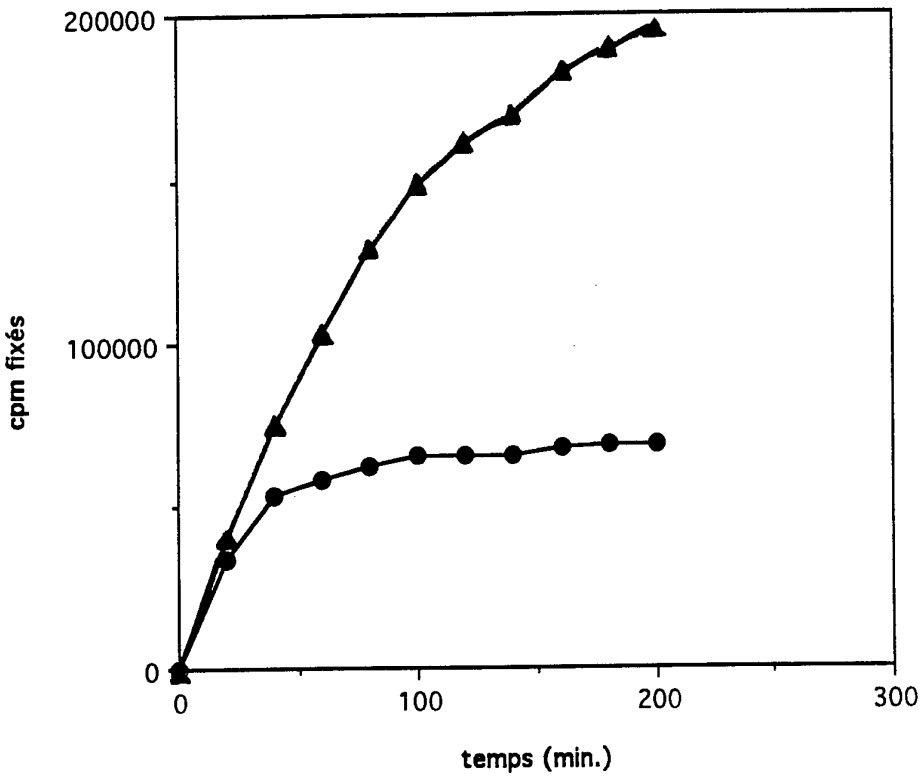
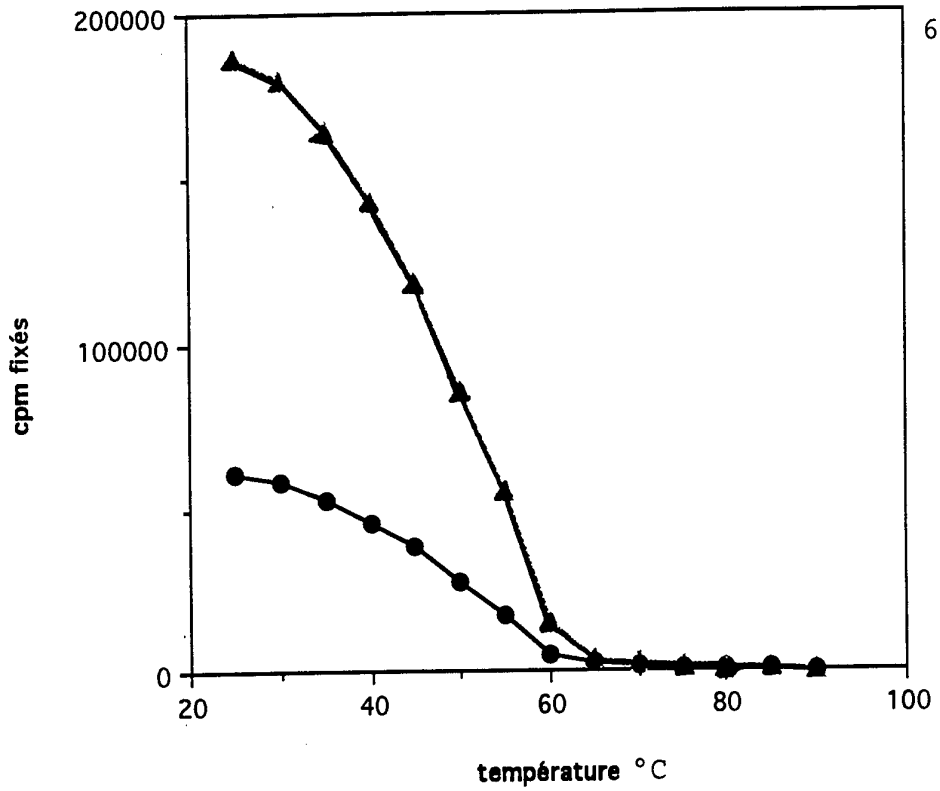


FIGURE 6


6a
200000
100000
0
cpm fixés
20
40
60
80
100
température °C

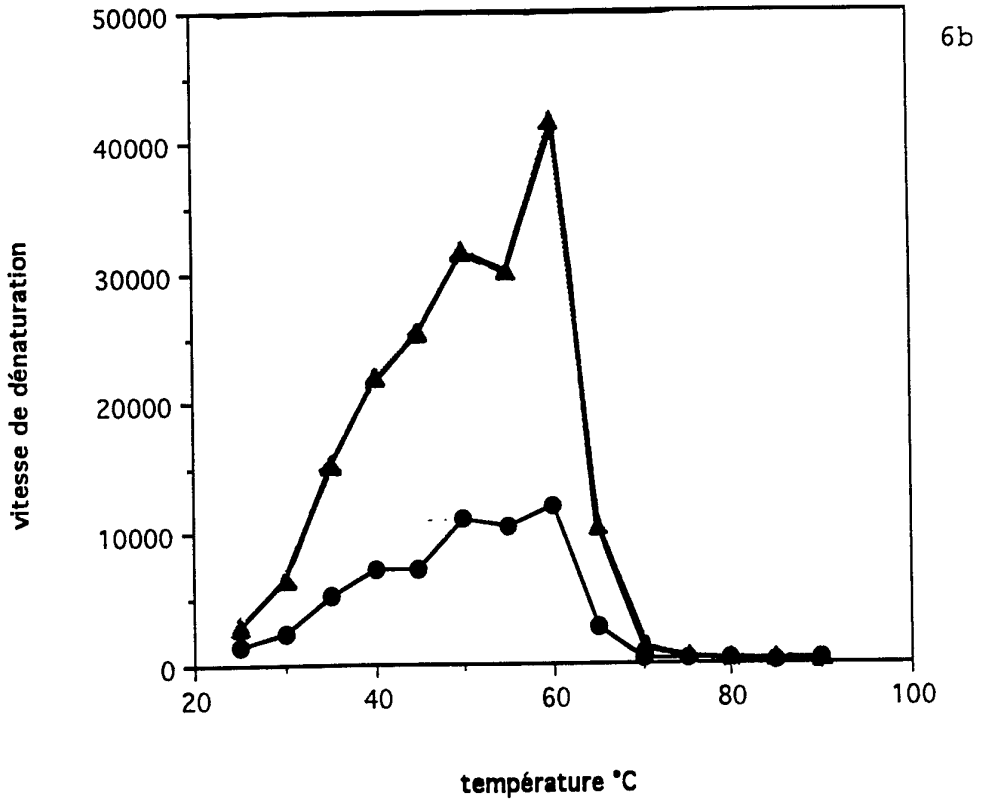
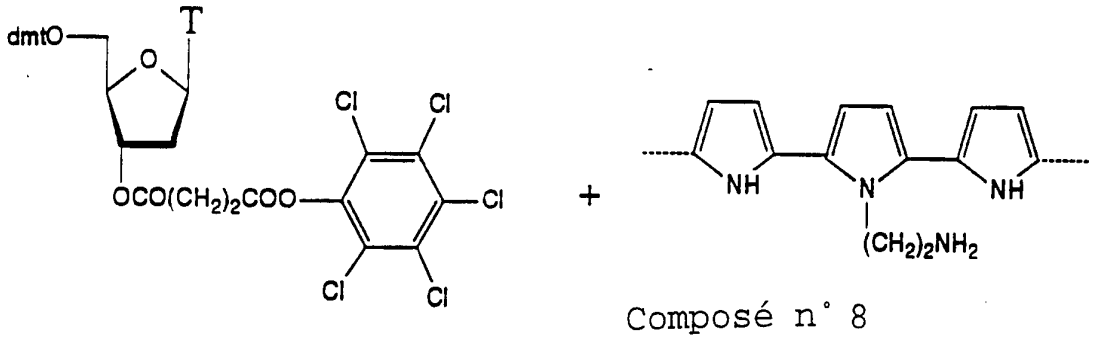
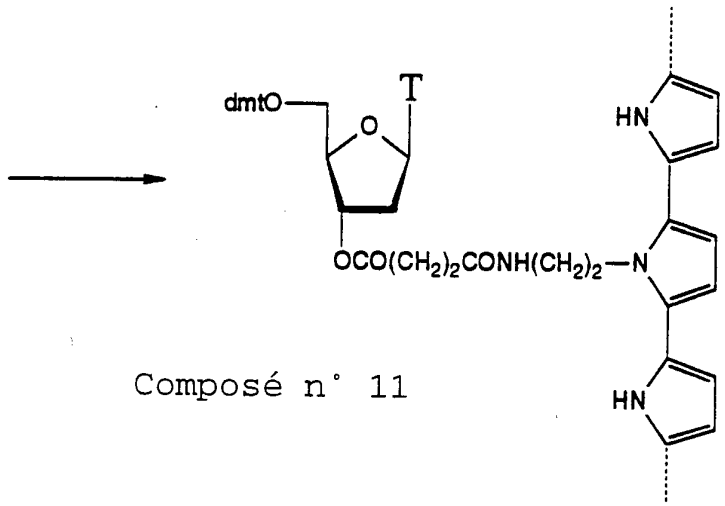

6b
50000
40000
30000
20000
10000
0
vitesse de dénaturation
20
40
60
80
100
température °C

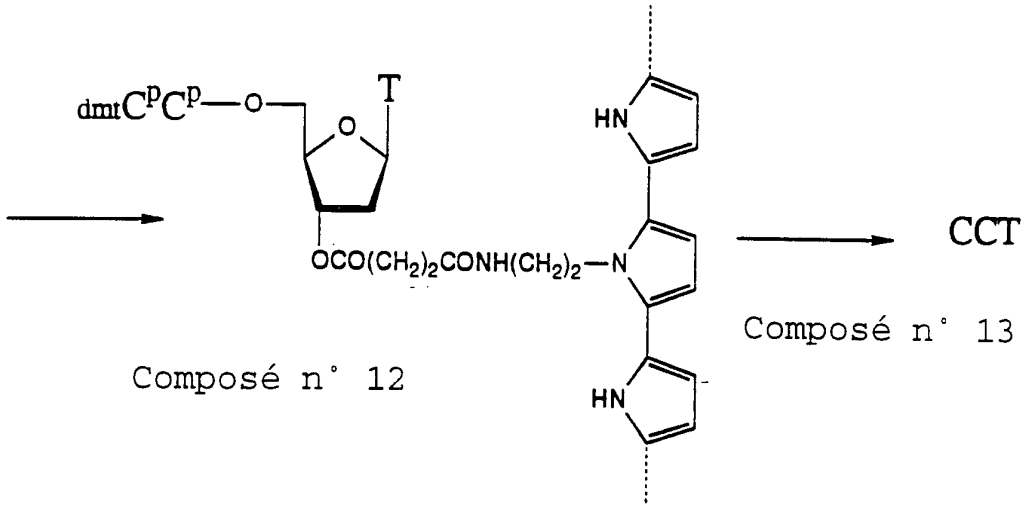
FIGURE 7



Composé n° 8



Composé n° 11



Composé n° 12

Composé n° 13

FIGURE 8

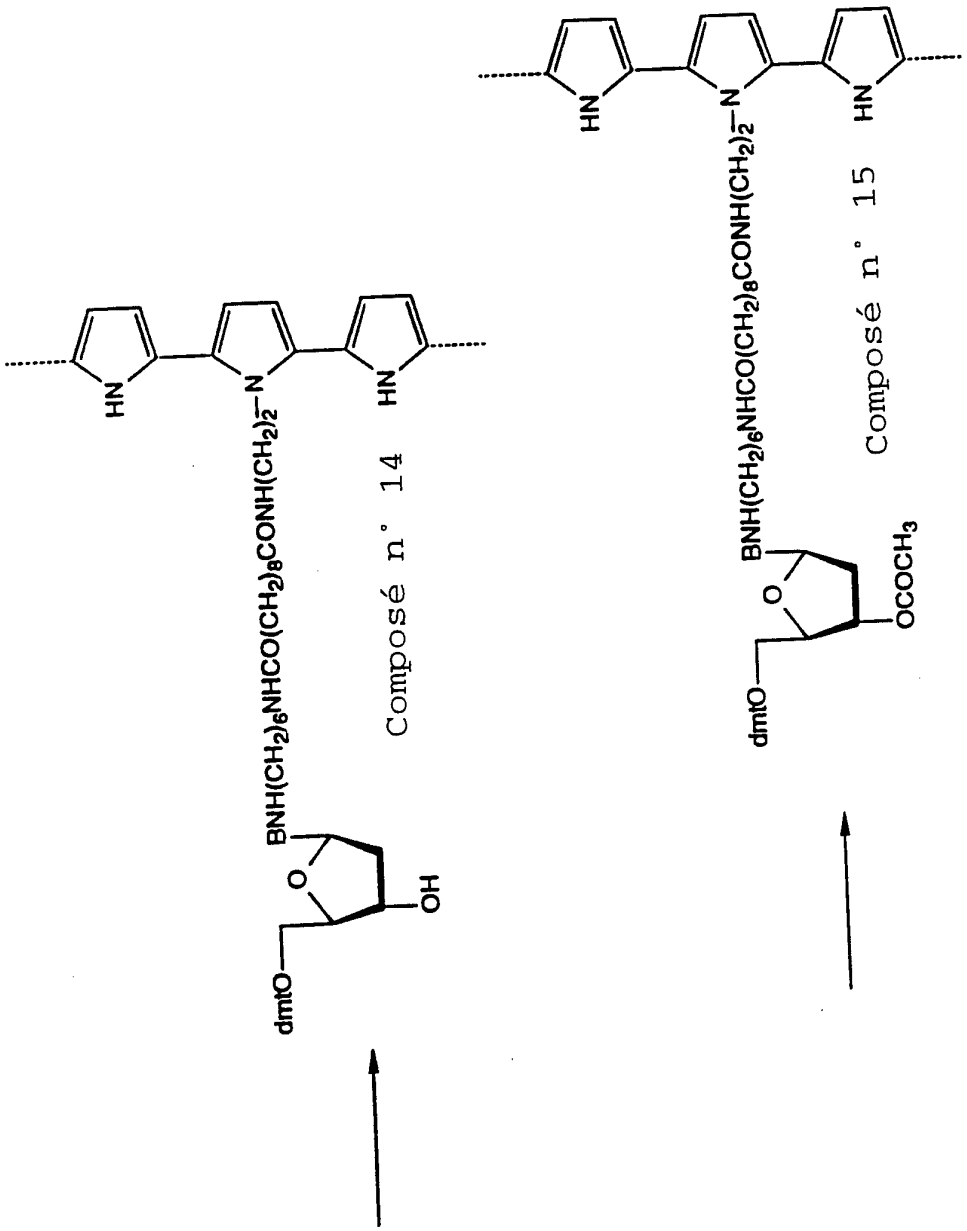

Composé n° 14
Composé n° 15
HN
N
HN
BNH(CH2)6NHCO(CH2)8CONH(CH2)2
O
OH
OCOCH3
dmtO

FIGURE 9

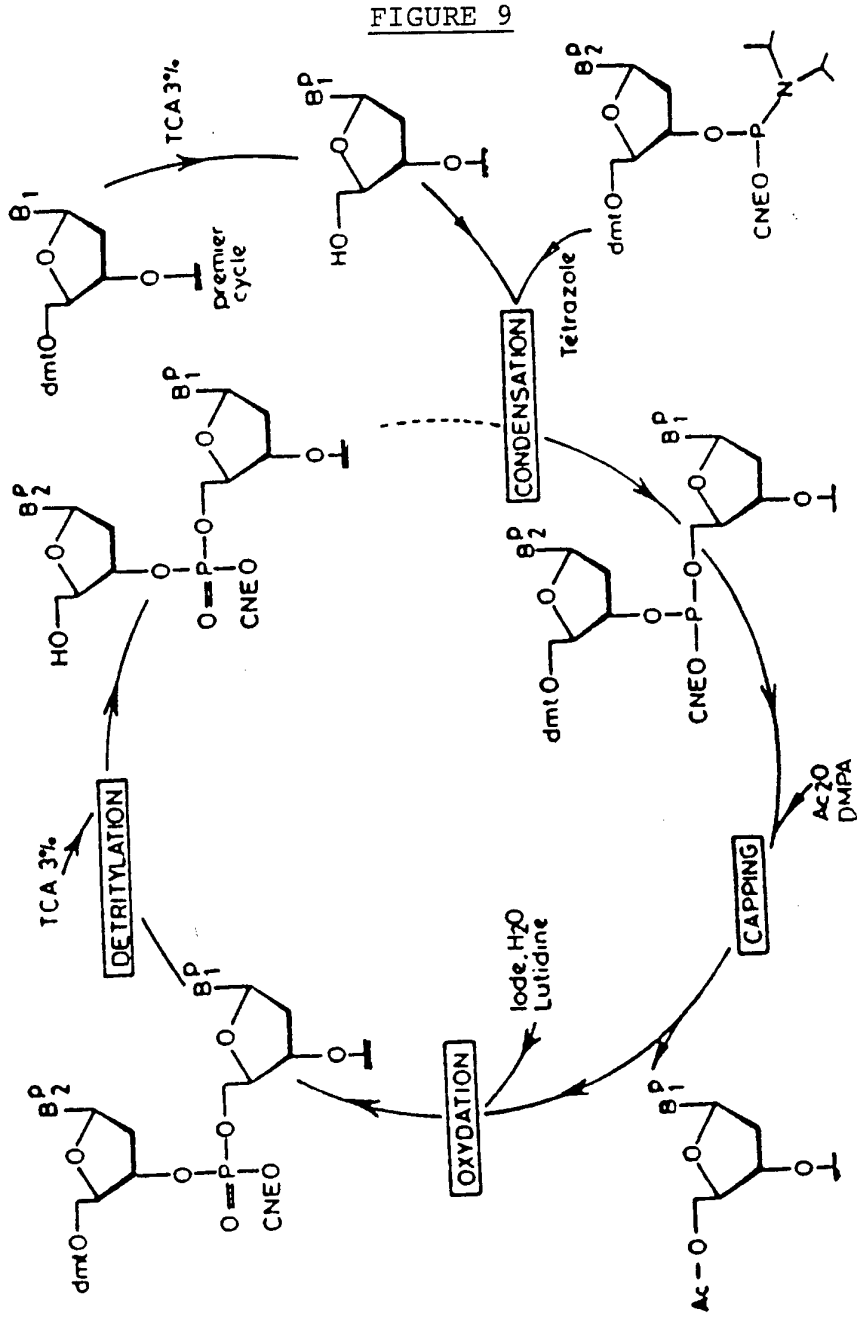
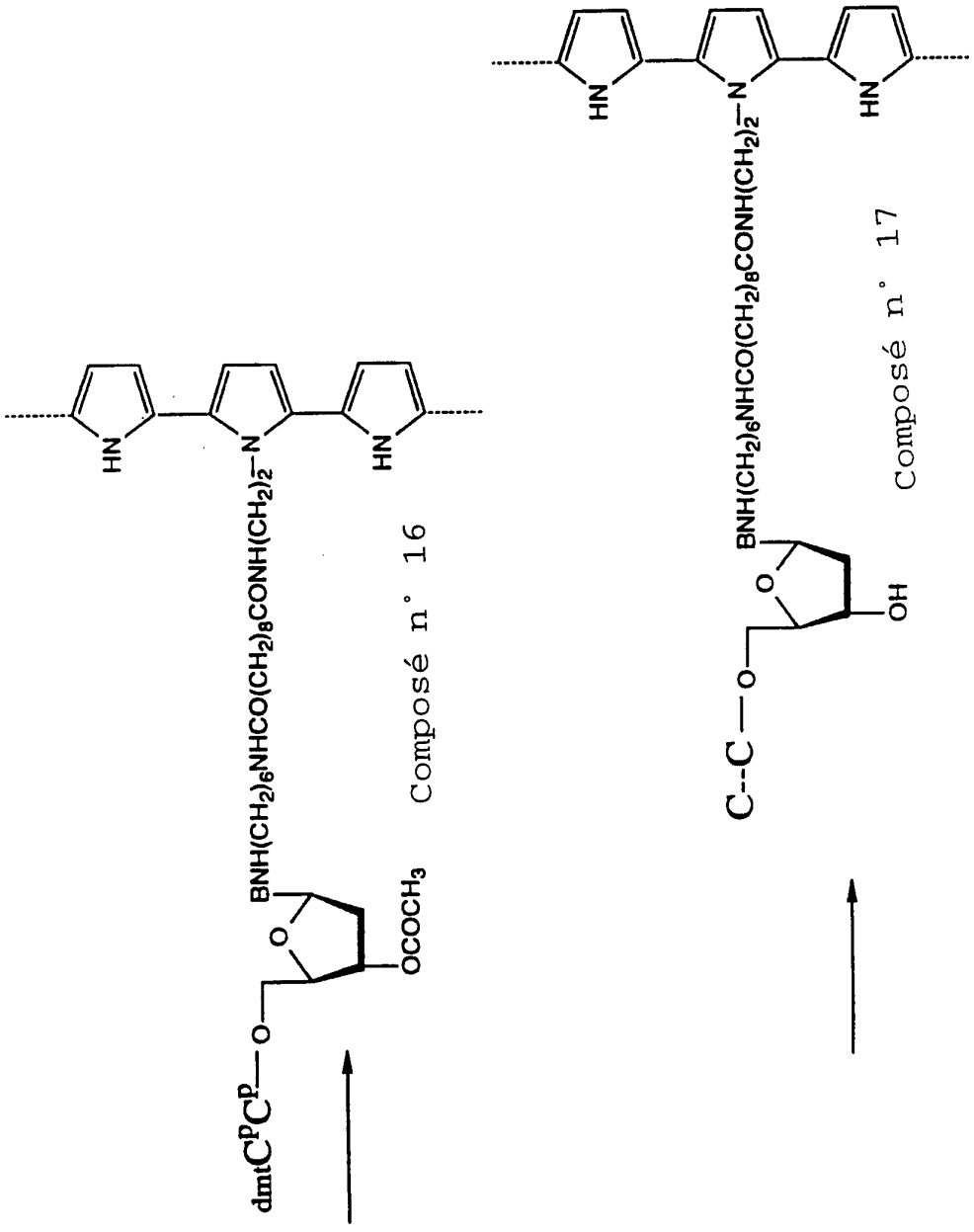

TCA 3%
premier cycle
Tétrazole
CONDENSATION
CAPPING
Ac2O DMPA
Iode, H2O Lutidine
OXYDATION
DETRITYLATION
TCA 3%
dmtO
HO
CNEO
Ac-O

FIGURE 10



Composé n° 16

Composé n° 17

FIGURE 11

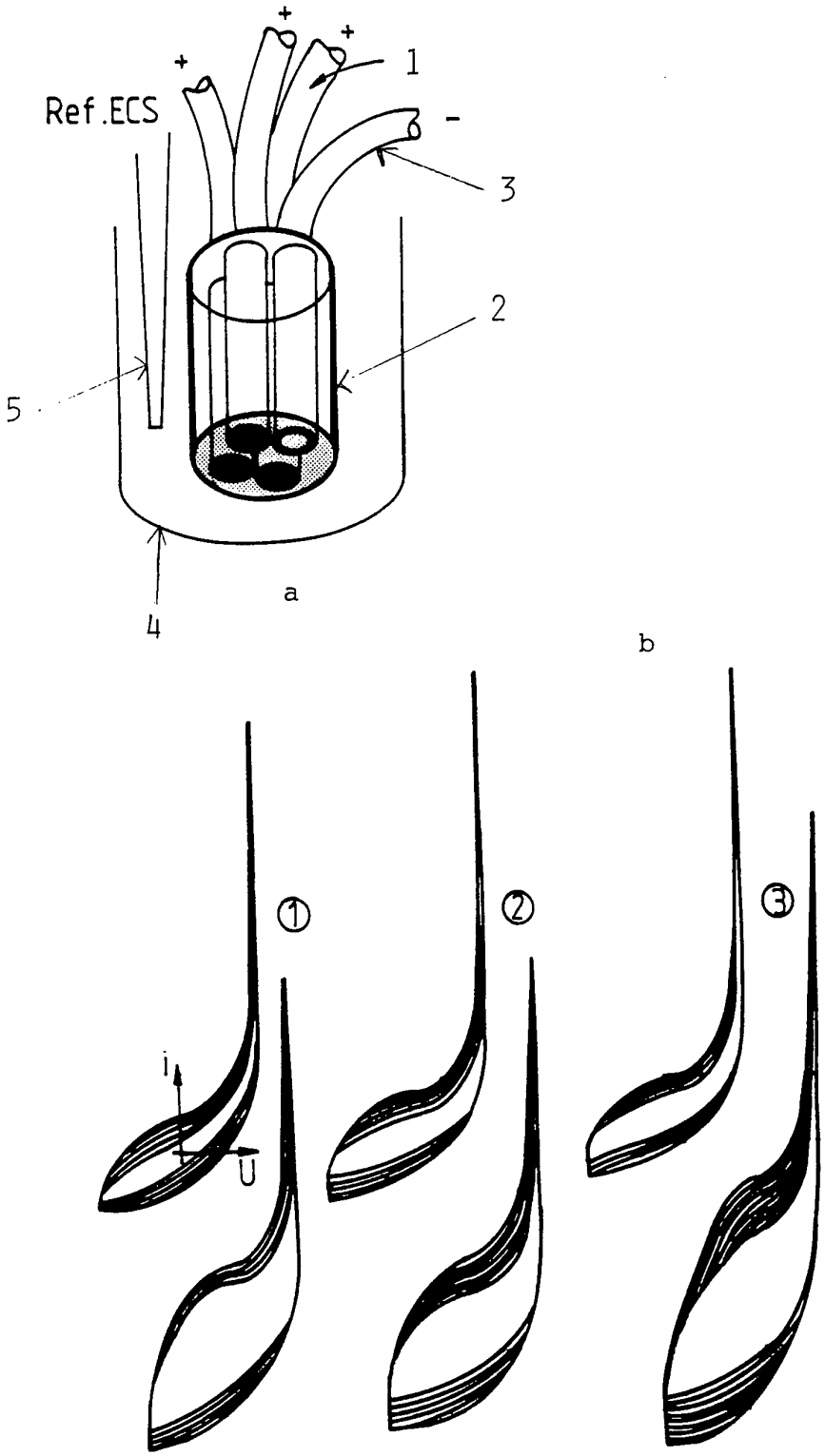


FIGURE 12

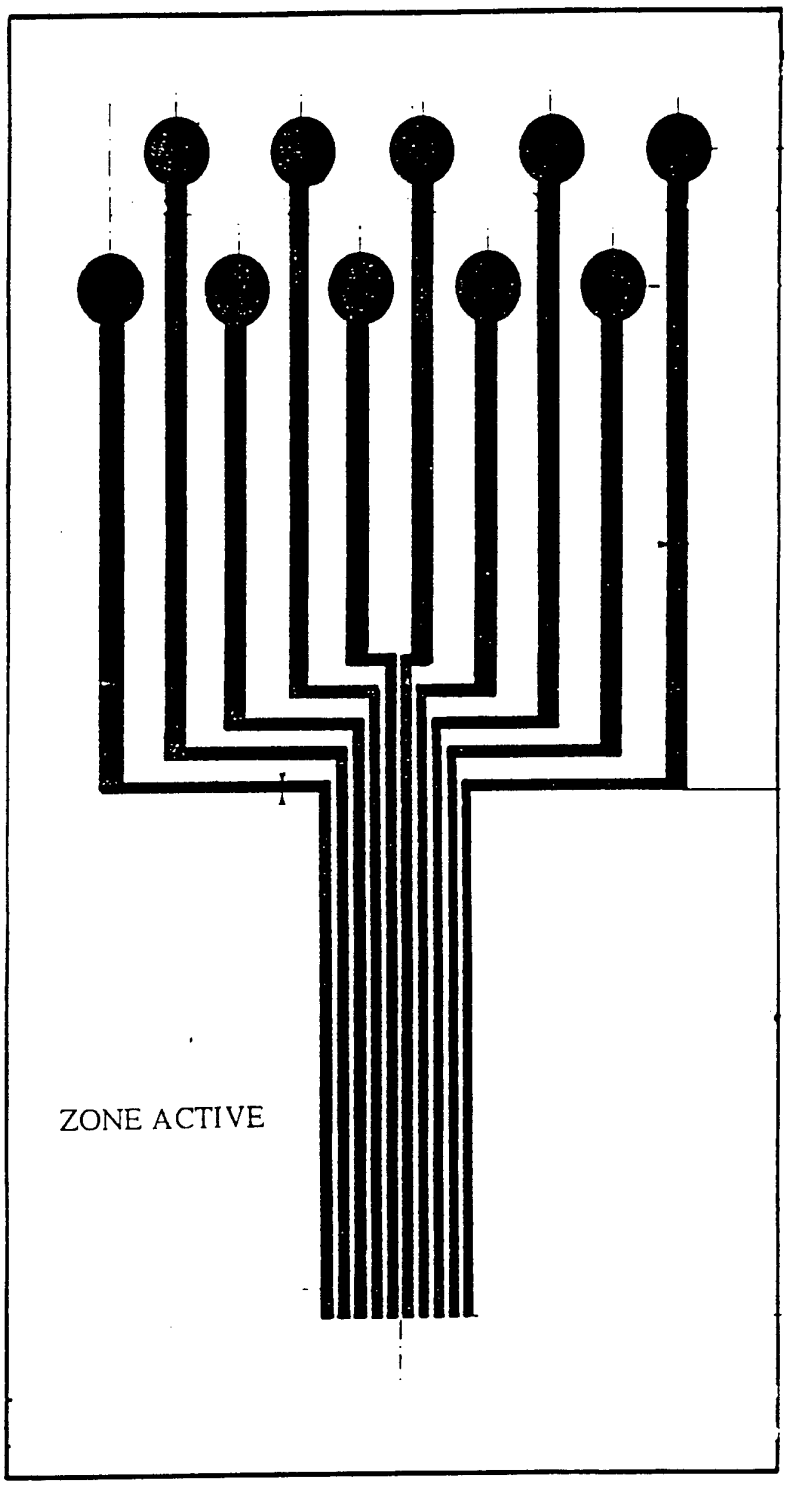


FIGURE 13

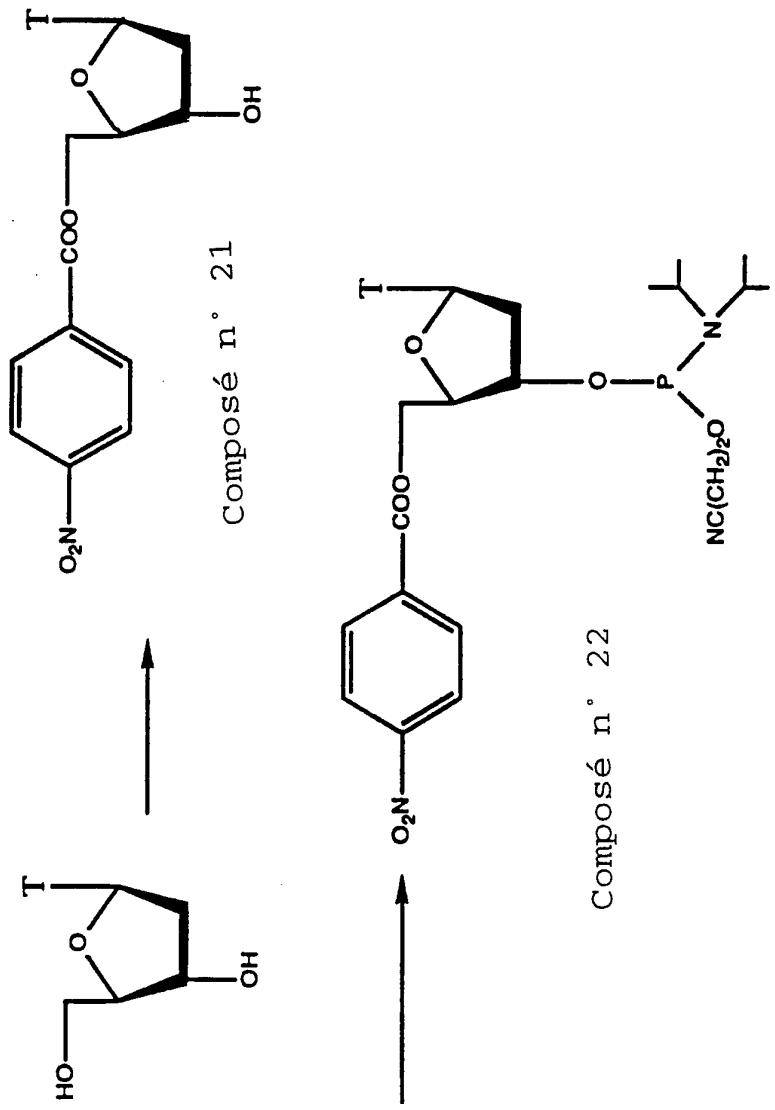
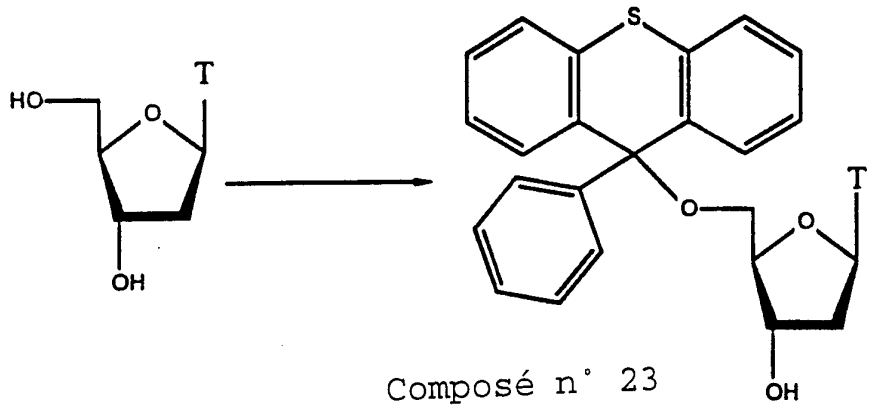
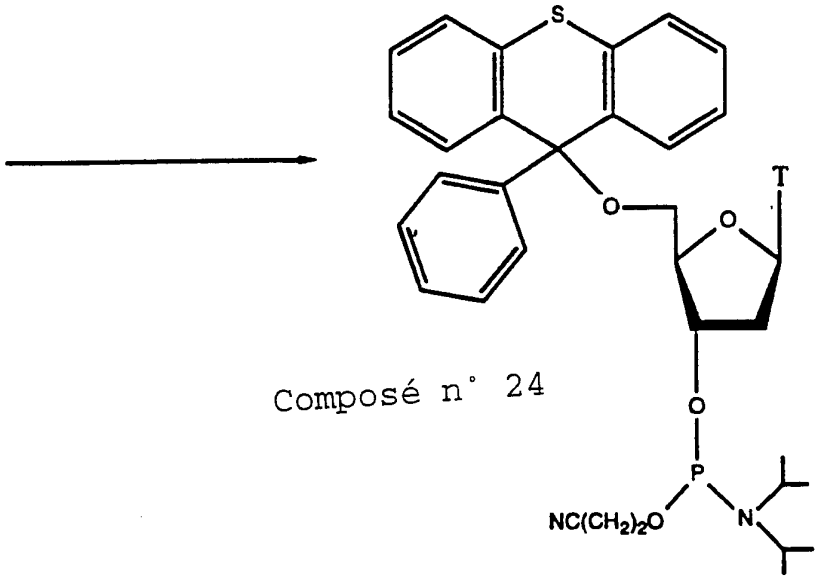

T
O
OH
COO
O2N
Composé n° 21
HO
T
O
O
P
N
NC(CH2)2O
COO
O2N
Composé n° 22

FIGURE 14

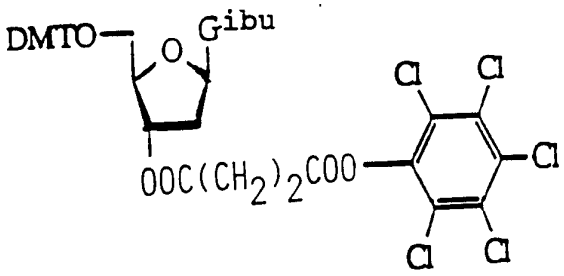


Composé n° 23



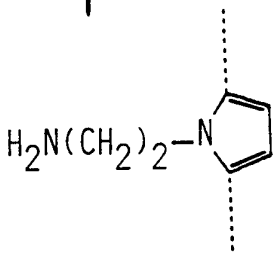
Composé n° 24

FIGURE 15

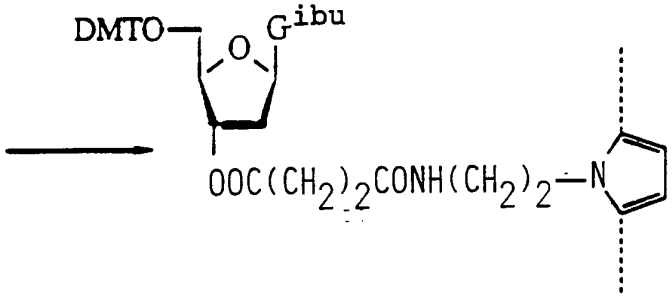


Composé n° 25

+



Composé n° 8



Composé n° 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/FR 94/00354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07H21/00 C12Q1/68 C25B3/10 C25B11/04 C08G61/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07H C12Q C08G C25B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 314 009 (MILES INC.) 3 May 1989 see page 2 - page 4	1
A	WO,A,91 08307 (MICROPROBE CORPORATION) 13 June 1991 see abstract; claims	13,15
A	WO,A,92 07882 (GENTA INCORPORATED) 14 May 1992 see claims; figures	13,14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 1994	17. 08. 94

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Day, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ir ıtıonal Application No
PCT/FR 94/00354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0314009	03-05-89	US-A-	4886625	12-12-89
		AU-A-	2433088	13-07-89
		AU-B-	626737	06-08-92
		AU-A-	6650790	14-03-91
		JP-A-	1252628	09-10-89
		US-A-	5210217	11-05-93
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A-	0504321	23-09-92
WO-A-9207882	14-05-92	AU-A-	8912291	26-05-92
		CA-A-	2094595	27-04-92
		EP-A-	0554407	11-08-93
		JP-T-	6502667	24-03-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D[illegible] de Internationale No
PCT/FR 94/00354

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C07H21/00 C12Q1/68 C25B3/10 C25B11/04 C08G61/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C07H C12Q C08G C25B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 314 009 (MILES INC.) 3 Mai 1989 voir page 2 - page 4	1
A	WO,A,91 08307 (MICROPROBE CORPORATION) 13 Juin 1991 voir abrégé; revendications	13,15
A	WO,A,92 07882 (GENTA INCORPORATED) 14 Mai 1992 voir revendications; figures	13,14

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 Août 1994	17. 08. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Day, G

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D ıde Internationale No
PCT/FR 94/00354

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0314009	03-05-89	US-A-	4886625	12-12-89
		AU-A-	2433088	13-07-89
		AU-B-	626737	06-08-92
		AU-A-	6650790	14-03-91
		JP-A-	1252628	09-10-89
		US-A-	5210217	11-05-93
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A-	0504321	23-09-92
WO-A-9207882	14-05-92	AU-A-	8912291	26-05-92
		CA-A-	2094595	27-04-92
		EP-A-	0554407	11-08-93
		JP-T-	6502667	24-03-94