

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 09.04.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.10.98 Bulletin 98/42.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL SOCIETE
ANONYME — FR et TEOULE ROBERT — FR.

⑦② Inventeur(s) : SAUVAIGO SYLVIE, TEOULE
ROBERT et BAZIN HERVE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ SYSTEMES DE DETECTION D'HYBRIDATION D'ACIDES NUCLEIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION
ET LEURS UTILISATIONS.

⑤⑦ L'invention est relative à des systèmes de détection
d'hybridation d'acides nucléiques, constitués par:

- un domaine de fixation A constitué par un polynuclo-
tide simple-brin;
- un domaine intermédiaire B, constitué par au moins un
synthon d'arrêt; et

- un domaine de visualisation C, constitué par un poly-
nucléotide double-brin, dans lequel est incorporé au moins
un nucléotide marqué constituant un moyen de détection.

Ces systèmes permettent l'amplification du signal d'hy-
bridation de sondes d'acides nucléiques sur des séquences
cibles.

FR 2 762 013 - A1



**SYSTEMES DE DETECTION D'HYBRIDATION D'ACIDES NUCLEIQUES,
LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS UTILISATIONS.**

La présente Invention est relative à des
moyens de détection de l'hybridation d'acides nucléiques,
5 utilisables en particulier pour le diagnostic.

Les techniques d'identification de séquences
d'ARN ou d'ADN (séquences cibles) dans un échantillon
mettent en oeuvre l'hybridation de la séquence cible avec
une sonde marquée, et la détection du duplex formé, après
10 élimination de la sonde non-hybridée.

Ces techniques sont couramment utilisées en
particulier pour le diagnostic de pathologies virales ou
infectieuses, pour la recherche médicale ou génétique,
l'identification de clones, l'analyse de gènes
15 transcrits, etc.

Deux types de sondes sont utilisées, les
sondes dites longues (généralement de taille supérieure à
100 bases) et les sondes courtes, de taille variant entre
10 et 30 bases de long. Les sondes les plus couramment
20 utilisées en diagnostic médical sont des oligonucléotides
de synthèse conjugués à un marqueur, soit par attachement
direct à ce marqueur, soit par conjugaison à un ligand ;
dans ce dernier cas, la détection s'effectue par
l'intermédiaire d'un marqueur fixé sur ce ligand.

25 On peut utiliser des marqueurs radioactifs ou
froids.

De nombreuses techniques de marquage sont
décrites par exemple par SAMBROOK et al., [Molecular
Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
30 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. Ces
méthodes incluent par exemple, dans le cas de marqueurs
radioactifs, le marquage en 5' d'oligonucléotides de
synthèse par l'enzyme polynucléotide kinase avec du $\gamma^{32}\text{P}$
ATP, ou encore l'incorporation de dCTP ou dATP radioactif
35 lors du marquage par translation de coupure (nick-
translation).

A titre d'exemple de marqueurs non-radioactifs, pouvant être incorporés par voie chimique dans des oligonucléotides de synthèse (Demande PCT WO 89/12462), on citera en particulier la biotine ; Des
5 analogues biotinylés de l'UTP peuvent également être incorporés par translation de coupure dans des ADN double-brin.

La biotine est généralement mise en évidence par l'intermédiaire de sa liaison à l'avidine, qui sert
10 elle-même de support d'attachement pour des molécules fluorescentes, des enzymes ou d'autres composés détectables.

Dans d'autres systèmes de marquage non-radioactif, des haptènes (groupe dinitrophényle, digoxigénine) remplacent la biotine, et des anticorps
15 spécifiques marqués servent de révélateurs au système.

La sensibilité des essais d'hybridation moléculaire est un facteur important qui est souvent limitant dans l'application des tests de diagnostic en
20 biologie moléculaire.

La sensibilité d'un essai dépend directement du marquage servant à révéler la sonde hybridée. Un des moyens d'améliorer la sensibilité d'un essai est d'amplifier le signal en augmentant le nombre de
25 marqueurs incorporés dans la sonde, afin d'obtenir des sondes dites « polymarquées ».

Dans ce but, il a par exemple été proposé d'utiliser l'enzyme terminal-transférase, qui est capable d'allonger une chaîne ADN simple-brin par addition à son
30 extrémité 3' d'analogues de nucléotides, par exemple de nucléotides biotinylés. L'inconvénient principal de cette méthode réside dans le fait que le nombre de nucléotides ajoutés par l'enzyme à l'extrémité de la chaîne ADN simple-brin est aléatoire. Il en résulte un mélange de
35 produits de différentes longueurs, ce qui rend le marquage difficilement reproductible, et produit des

sondes hétérogènes, difficiles à standardiser et donc non-adaptées au diagnostic médical.

COLLINS (Demande EP 204 510) propose une variante dans laquelle la sonde est allongée par une queue homopolymérique (poly A) en utilisant l'enzyme terminal-transférase. Le marqueur est alors constitué d'un homopolymère (poly T) dans lequel sont incorporées des molécules détectables. Ce système ne permet toutefois pas d'éliminer complètement les inconvénients résultant de l'impossibilité de contrôler l'action de l'enzyme.

Il a également été proposé d'amplifier le signal en d'utilisant des sondes oligonucléotidiques polymarquées ramifiées, ou bien reliées entre elles par des "ponts" polynucléotidiques s'hybridant à leurs extrémités, comme décrit respectivement dans les Demandes EP 292 128 et EP 450 594, au nom de SEGEV.

Le Brevet US 4,882,269 décrit un système dans lequel des sondes secondaires polymarquées s'hybrident sur plusieurs sites d'une sonde primaire.

La Demande EP 0317 077 ainsi que la Demande PCT WO 92/02526 décrivent un système dans lequel les sondes secondaires sont constituées par des constructions polynucléotidiques polymarquées en forme de peigne. Ces systèmes présentent l'inconvénient de nécessiter la synthèse de nombreux oligonucléotides différents, ainsi que la mise en œuvre d'étapes d'hybridation et/ou de ligation pour former les constructions finales. En outre, il est difficile d'obtenir des produits finaux homogènes dans leurs caractéristiques, et leur purification est délicate.

La présente Invention a pour but de proposer un système permettant l'amplification du signal d'hybridation, dépourvu des inconvénients mentionnés ci-dessus, et simple à obtenir, à purifier et à utiliser.

La présente invention a pour objet un système de détection d'hybridation d'acides nucléiques permettant

la détection d'une séquence cible, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- un domaine de fixation A, constitué par un polynucléotide simple-brin ;
- 5 - un domaine intermédiaire B, constitué par au moins un synthon d'arrêt ; et
- un domaine de visualisation C, constitué par un polynucléotide double-brin, dans lequel est incorporé au moins un nucléotide marqué constituant un moyen de
- 10 détection.

Des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention sont schématisés sur la Figure 1.

La taille du domaine de fixation A est avantageusement comprise entre 8 et 40 nucléotides de

15 long, préférentiellement 15 à 25 nucléotides. Ce domaine A se fixe à la séquence cible à détecter, soit par hybridation directe, soit par l'intermédiaire d'au moins un adaptateur ; on entend par « adaptateur » une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence

20 simple-brin complémentaire de la séquence cible à détecter et au moins une séquence simple-brin en partie complémentaire du domaine A.

On entend par « synthon » une molécule (analogue de nucléotide ou autre) possédant la capacité

25 d'être incorporée dans un polynucléotide de synthèse.

Le « synthon d'arrêt » du domaine B utilisé dans le cadre de la présente invention, est un synthon qui possède en outre la propriété de provoquer un arrêt de la polymérase lorsqu'il est rencontré sur le brin

30 matrice lors d'une réaction de copie ou d'élongation d'un polynucléotide. Ceci permet l'obtention de systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention, par le procédé qui sera décrit plus loin.

Des synthons utilisables comme synthons

35 d'arrêt sont par exemple choisis parmi les alcanes diol, ou tout autre composé tels que ceux décrits par exemple

par WILK et al. [Nucleic Acids Res., 18, pp. 2065-2068, (1990)], par KUBAREVA et al. [Nucleic Acids Res., 20, pp. 4533-4538, (1992)], par NEWTON et al. [Nucleic Acids Res., 21, pp. 1155-1162, (1993)], ainsi que dans la
5 Demande EP 416 817 au nom de IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC.

Les moyens de détection incorporés dans le domaine C constituent un amplificateur de signal permettant la visualisation du système de détection
10 d'hybridation. Des moyens de détection utilisables dans le cadre de la présente invention sont, de manière générale les marqueurs, connus en eux-mêmes, classiquement utilisés pour marquer les sondes d'acide nucléique en vue de permettre leur visualisation. Il
15 s'agit en particulier de nucléotides ou d'analogues de nucléotides, pouvant être incorporés par une polymérase dans une chaîne oligonucléotidique, et pouvant être marqués de manière à être détectés soit directement, par exemple dans le cas d'un marquage radioactif ou par une
20 molécule fluorescente, soit indirectement, par exemple dans le cas de ligands, (tels que la biotine ou un haptène), révélés par l'intermédiaire de la fixation de molécules marquées (telles que l'avidine ou un anticorps). Ils peuvent également être introduits dans la
25 chaîne polynucléotidique sous forme de précurseurs de marquage destinés à être modifiés ultérieurement afin de produire la molécule émettant le signal de visualisation.

Avantageusement, au moins 1/50, de préférence au moins 1/10, et de manière tout à fait préférée au
30 moins 1/5, des monomères constitutifs du domaine double-brin C des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention, sont des nucléotides ou analogues de nucléotides marqués, tels que définis ci-dessus. Ces monomères marqués peuvent être incorporés dans un seul
35 des brins du domaine C ; pour obtenir un marquage plus

important et un signal plus élevé, on préférera généralement les incorporer dans chacun des deux brins.

Le niveau du signal généré par le système de détection d'hybridation dépend également de la taille du
5 domaine double-brin C ; avantageusement , celle-ci est comprise entre 0,1 et 50 kb, et préférentiellement entre 1 et 10 kb.

En revanche, la séquence du domaine double-brin C n'est pas primordiale, dans la mesure où ce
10 polynucléotide a pour seule fonction de permettre la visualisation du système de détection d'hybridation, grâce aux nucléotides marqués qui y sont incorporés.

Préférentiellement, les systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention sont obtenus en
15 incorporant au moins un nucléotide ou analogue de nucléotide marqué, tel que défini ci-dessus, par extension enzymatique d'au moins une amorce contenant au moins un synthon d'arrêt tel que défini ci-dessus.

L'invention englobe également un procédé
20 d'obtention des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention, dans lequel l'on effectue la synthèse d'au moins l'un des brins du domaine C à l'aide d'une polymérase dans un mélange réactionnel approprié, caractérisé en ce que tout ou partie d'au moins l'un des
25 nucléotides triphosphate dudit mélange réactionnel est remplacé par l'un de ses dérivés marqués, et en ce qu'il comprend au moins une étape a) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase, en présence d'un brin matrice, d'une amorce P' comprenant, de 5' en 3', un
30 domaine A et un domaine B tels que définis ci-dessus, et un domaine X constitué par une séquence capable de s'hybrider audit brin matrice pour amorcer la polymérisation.

L'amorce P' est schématisée sur la Figure 2.

35 Dans ces conditions, les dérivés marqués de nucléotides sont incorporés par la polymérase dans le

produit d'élongation d'amorce néo-synthétisé, à la place de tout ou partie des nucléotides correspondants.

On peut ainsi obtenir un marquage important du domaine C. Par exemple, dans le cas théorique d'un
5 fragment de 10 kb, (c'est-à-dire 20 000 nucléotides si le fragment est double brin), si l'on remplace 1/3 des thymidines triphosphates par un analogue marqué, et en considérant que l'on dispose d'une séquence à amplifier dans laquelle les 4 bases se trouvent en proportions
10 égales, on obtient un fragment dans lequel sont incorporés plus de 800 monomères marqués/brin.

La matrice à partir de laquelle on obtient le domaine C peut avoir une séquence quelconque, dénommée ci-après « séquence neutre », du fait qu'elle est en
15 particulier totalement indépendante des séquences cibles que l'on envisage de détecter à l'aide des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention. Pour améliorer le rendement de la réaction, en particulier dans le cas où l'on met en œuvre une réaction
20 d'amplification en chaîne par polymérase, on choisira de préférence, une séquence riche en bases A et T, ce type de séquence s'amplifiant généralement mieux que les séquences riches en G et C.

Le domaine A en 5' de l'amorce P' doit être
25 choisi de façon à ne pas interférer dans l'élongation de la séquence neutre ; en particulier, il ne doit pas s'hybrider de façon stable avec celle-ci (ce qui peut être vérifié au préalable grâce à des logiciels d'analyse d'homologie de séquence). Ce domaine ne doit pas non plus
30 présenter de complémentarité de séquence avec le domaine X de la même amorce P', ou avec une quelconque région de l'amorce P".

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, le procédé conforme à l'invention comprend en outre une
35 étape b) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase, en présence d'un brin matrice constitué

par le produit d'élongation de l'amorce P', d'une seconde amorce P" comprenant une séquence capable de s'hybrider audit brin matrice pour amorcer la polymérisation.

Dans ce cas, l'élongation de l'amorce P" se poursuit jusqu'à ce que la polymérase rencontre un synthon d'arrêt présent dans le produit d'élongation de l'amorce P' ; l'hybridation des produits d'élongation ainsi obtenus génère un système de détection d'hybridation conforme à l'Invention, possédant les domaines A, B, et C tels que définis ci-dessus.

La position de l'amorce P" et de la partie X de l'amorce P' sur leurs matrices respectives conditionne la taille du domaine C. Celle-ci peut être très importante. En effet, différentes techniques connues de l'homme du métier permettent d'obtenir facilement et avec de bons rendements, des fragments d'élongation de plusieurs dizaines de kilobases [BARNES, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, p. 2216-2220 (1994); CHENG et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, p. 5695-5699, (1994)].

L'amorce P" comprend au moins la séquence capable de s'hybrider audit brin matrice pour amorcer la polymérisation; toutefois, elle peut comprendre en outre, un domaine A et un domaine B tels que définis ci-dessus, et donc avoir la même structure que l'amorce P'. Dans ce cas, les domaines A et B des amorces P' et P" peuvent être identiques ou différents.

Avantageusement, le procédé conforme à l'invention comprend en outre une étape c) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase de l'amorce P', en présence d'un brin matrice constitué par le produit d'élongation de l'amorce P".

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, les étapes b) et c) sont répétées jusqu'à obtention de la quantité souhaitée de systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention. Dans ce but, le procédé conforme à l'invention pourra être mis en

œuvre dans les conditions usuelles des méthodes connues d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La publication de NEWTON et al., et la Demande EP 416 817, citées ci-dessus, décrivent l'utilisation de
5 synthons d'arrêt dans des amorces de PCR. Ces amorces comprennent une séquence nucléotidique capable de s'hybrider à une séquence cible, et une queue polynucléotidique, séparées par un synthon d'arrêt. Lorsqu'une amorce de ce type est utilisée pour
10 l'amplification d'une séquence cible dans une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, la queue polynucléotidique n'est pas copiée, et le produit d'amplification final se présente donc sous forme d'une copie double-brin de la séquence cible, pourvue d'une
15 queue polynucléotidique simple-brin. Cette queue polynucléotidique peut être utilisée pour fixer la séquence cible amplifiée sur un support solide, ou pour la visualiser, par l'intermédiaire d'une sonde marquée complémentaire de ladite queue.

20 Cependant, le procédé décrit dans ces documents, qui a pour but l'amplification d'une séquence cible spécifique, tout en la dotant de moyens de capture sur un support solide, et/ou de moyens permettant son hybridation avec une sonde par l'intermédiaire de
25 laquelle on pourra la détecter, aboutit à des produits qui sont très différents par leur destination, et de ce fait par leur constitution, des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention. En particulier, il n'est pas envisagé, dans ces documents, d'incorporer des
30 moyens de détection, tels que des oligonucléotides marqués, dans la portion double-brin résultant de l'amplification.

Dans le cadre de la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, les problèmes de fidélité des ADN
35 polymérases ne se posent pas, dans la mesure où le degré d'homologie entre le domaine C et la « séquence neutre »

utilisée comme matrice initiale ne joue aucun rôle, et où seuls importent la longueur du domaine C et le nombre de marqueurs qui peuvent y être incorporés.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, on
5 peut utiliser dans le procédé conforme à l'invention plusieurs types d'amorces P' différant entre elles par la séquence du domaine A, et identiques entre elles en ce qui concerne la séquence du domaine X.

La présente invention a également pour objet
10 un nécessaire pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une amorce P' telle que définie ci-dessus, un polynucléotide utilisable comme matrice pour l'élongation de ladite amorce, et un nucléotide triphosphate marqué.
15 Avantageusement ledit nécessaire comprend en outre une amorce P".

Pour purifier les systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention à l'issue de la réaction enzymatique ayant permis leur obtention, de
20 nombreuses méthodes de purification connues en elles-mêmes sont utilisables. Ces méthodes permettent l'élimination des nucléotides triphosphates et des amorces non incorporés et de l'enzyme résiduelle. Les fragments recherchés sont récupérés avec de bons
25 rendements. Ces méthodes sont applicables directement sur le produit de la réaction enzymatique, ou bien après son isolation après migration sur gel d'électrophorèse.

La qualité des fragments d'amplification obtenus est facilement contrôlable par électrophorèse sur
30 gel d'agarose. Si de bonnes conditions d'amplification sont sélectionnées, une seule bande est observée sur gel. Le produit purifié est quantifiable par spectrométrie UV ou bien par dosage du marqueur incorporé.

La mise en oeuvre du procédé conforme à
35 l'Invention permet d'obtenir de façon simple et reproductible, des systèmes de détection d'hybridation

marqués ayant des caractéristiques homogènes, qui sont faciles à quantifier et à purifier par des méthodes classiques, et qui ont une très haute activité spécifique, supérieure à celle des sondes marquées
5 obtenues habituellement par translation de coupure.

En outre, les systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention présentent les avantages suivants :

- ils possèdent une cinétique d'hybridation
10 très rapide, correspondant à peu près à la cinétique d'hybridation des oligonucléotides ; comme dans le cas des oligonucléotides, cette cinétique est essentiellement liée à leur concentration dans le milieu et par rapport à la séquence cible ; ceci permet de définir facilement les
15 conditions d'hybridation et de lavage nécessaires à la spécificité d'hybridation des systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention.

- le domaine de reconnaissance C étant sous forme double-brin, il ne présente pas de risques
20 d'hybridation croisée avec la séquence cible et donc, il n'y a pas de problème de bruit de fond.

- les molécules incorporées dans ce domaine de reconnaissance et servant à la révélation sont suffisamment espacées pour qu'il n'y ait pas
25 d'encombrement stérique gênant éventuellement leur liaison avec un ligand.

Les systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention peuvent être utilisés pour la détection d'une ou plusieurs séquences cibles dans un
30 échantillon biologique.

Pour détecter simultanément plusieurs séquences cibles, on peut utiliser simultanément plusieurs systèmes de détection d'hybridation, différant entre eux par la séquence du domaine A. On peut également
35 utiliser des systèmes de détection d'hybridation différant aussi entre eux par la séquence du domaine C

et/ou par la nature des nucléotides marqués incorporés dans ledit domaine.

La ou les séquence(s) cible(s) à détecter peuvent être fixées sur un support solide.

5 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit support solide comprend au moins une électrode. La ou les séquence(s) cible(s) peuvent être fixées sur cette électrode en utilisant par exemple les méthodes décrites dans la Demande PCT
10 WO/94/22889. Avantageusement, ledit support solide est constitué par une pluralité d'électrodes, qui sont de préférence des microélectrodes, et dont au moins 2 portent chacune une séquence cible différente.

Les systèmes de détection d'hybridation
15 conformes à l'invention peuvent être employés directement pour la reconnaissance d'une séquence cible ; dans ce cas, le domaine A sera choisi de manière à ce que sa séquence soit complémentaire de la séquence cible à détecter.

20 Avantageusement, on pourra utiliser également un adaptateur intermédiaire d'hybridation, tel que défini ci-dessus. Cet adaptateur est constitué par au moins un oligonucléotide de longueur comprise entre 15 et 50 bases, qui peut aisément être synthétisé automatiquement
25 sur synthétiseur d'ADN.

Dans ce cas, on peut utiliser pour détecter différentes séquences cibles, le même système de détection d'hybridation, qui peut être préparé en grande quantité et stockée à -20°C sans perte de ses propriétés.

30 La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention et d'utilisation de systèmes de détection d'hybridation conformes à l'Invention.

35 Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de

l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Obtention de systèmes de détection d'hybridation conformes à l'invention.

- 5 A) Obtention d'un système de détection d'hybridation à partir d'un fragment de 1010 paires de bases d'ADN humain.

- Amorces P' :

J₁₅(stop)₂H₁₂₁₇₀:

- 10 5' ACC ATC GCT TCC AGA (STOP)₂ GCA AGG CAG GAG CTG CAG GA 3'

- Amorces P" :

H₁₃₁₈₀:

5' GAT TGC CCT AGA GTG CAG TG 3'

- 15 Les conditions d'amplification ont d'abord été mises au point avec des amorces non modifiées, c'est-à-dire ne comportant pas les domaines A et B. L'amplification a ensuite été reproduite avec l'amorce P' modifiée comportant les trois domaines A, B et C.

- 20 L'amplification est réalisée sur 0,1 µg d'ADN génomique humain (CLONTECH), en présence de 10 pmoles de chacune des amorces, 2,5 unités de Taq polymérase (CIS BIO INTERNATIONAL), 5 µl de tampon 10 X (Tris/HCl 100 mM, pH 9 ; KCl 500 mM ; MgCl₂ 15 mM ; Triton X100 1 %, BSA 2 mg/ml) CIS BIO INTERNATIONAL), 0,75 µl de chacun des
25 nucléotides triphosphate (solutions à 20 mM, BOEHRINGER MANNHEIM). Après une première dénaturation à 94°C, 5 minutes, on effectue 35 cycles des séquences suivantes : 94°C 1 min. 30", 60°C 1 min. 30", 70°C 1 min. 30", et une dernière élongation 5 min. à 70°C. Le résultat est
30 visualisé après migration sur gel NUSIEVE®/AGAROSE (2%/1%).

Une seule bande, de la longueur attendue, est obtenue.

- 35 Le rendement et la spécificité de la réaction avec l'amorce modifiée et l'amorce non modifiée sont équivalents.

B) Obtention d'un système de détection d'hybridation à partir de fragments de 6023 et 10709 paires de bases d'ADN du phage λ .

- Amorces P' :

5 - J₁₅(stop)₂ λ_1 :

5' ACC ATC GCT TCC AGA(STOP)₂ GCT GAA GTG GTG GAA ACC GC 3'

- Amorces P" :

- λ_{6528} :

5' CTG CCT GCA TCT CTT CGA CC 3'

10 ou bien

- λ_{11215} :

5' CAG CGA CCT TGT CCA CCT CC 3'

L'amorce J₁₅(stop)₂ λ_1 permet d'amplifier un fragment de 6023 pb lorsqu'elle est utilisée avec
15 l'amorce λ_{6528} , et un fragment 10709 pb lorsqu'elle est utilisée avec l'amorce λ_{11214} .

On utilise le kit XL PCR (PERKIN ELMER) en suivant le protocole préconisé par le fabricant et la technique du démarrage à haute température (hot-start).

20 La phase inférieure du milieu réactionnel est préparée dans des tubes de 500 μ l à paroi mince (PERKIN-ELMER) selon les instructions du fabricant. On utilise 40 pmoles d'amorces et 1,1 mM final en Mg(OAc)₂. La phase inférieure est recouverte de cire (PERKIN-ELMER) ; la
25 phase supérieure est ensuite rajoutée. L'amplification est réalisée à partir de 1 ng d'ADN de phage λ .

L'amplification se déroule selon le protocole suivant :

- 94°C, 1 minute ;
- 30 - 10 cycles : 94°C 15 sec./68°C 5 minutes ;
- 20 cycles : 94°C 15 sec./68°C 5 minutes avec des incréments de 15 secondes à chaque cycle ;
- une dernière élongation 10 minutes à 72°C.

Les produits d'amplification sont contrôlés
35 après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et coloration

au bromure d'éthidium. On n'observe qu'une seule bande de la longueur attendue.

C) Obtention d'un système de détection d'hybridation à partir d'un fragment de 20874 paires de bases d'ADN du

5 phage λ .

- Amorce P' :

$$- K_{20}(\text{stop})_2 \lambda_1 :$$

5' CAC GTG GCT ACC ATG CCA TTT(stop)₂ GCT GAA GTG GTG GAA ACC GC

- Amorce P" :

$$10 - \lambda_2 :$$

5' GCC TCG CAT ATC AGG AAG CAC

L'amplification est réalisée avec les amorces λ_2 et $K_{20}(\text{stop})_2\lambda_1$ sur 1 ng d'ADN de phage λ . Les réactifs sont les mêmes qu'en B, ci-dessus. Les conditions

15 d'amplification sont les suivantes :

- 94°C 1 min. ;

- 18 cycles 94°C 1 min/68°C 10 min. ;

- 15 cycles 94°C 1 min./68°C 10 min. avec

incréments de 15 sec à chaque cycle ;

20 - 10 min. à 72°C.

L'amplification est contrôlée après électrophorèse sur gel d'agarose 0,6%.

On observe une seule bande de la taille attendue.

25 Pour vérifier que le domaine A est bien sous
forme simple-brin après amplification, on utilise
l'oligonucléotide complémentaire du domaine A de l'amorce
 $K_{20}(\text{stop})_2\lambda_1$, de séquence :

5' TGG CAT GGT AGC CAC GTG 3'

30 cet oligonucléotide est marqué en 5' par la
polynucléotide kinase, en présence de γ ^{32}P ATP. Il est
hybridé en solution 10 minutes à 37°C avec 5 μl du
produit d'amplification, dans un tampon PBS 1 X, NaCl
0,25 M. Le produit d'hybridation est séparé par
35 électrophorèse sur gel d'agarose 0,6%. Le gel est séché
puis autoradiographié pendant 1 nuit. L'autoradiographie

montre que la radioactivité est localisée en haut du gel au niveau de la bande d'amplification, ainsi qu'en bas du gel, au niveau de l'oligonucléotide marqué non hybridé.

La présence de la radioactivité au niveau de la bande de 20,8 kb montre que l'on a bien une hybridation de l'oligonucléotide marqué sur un fragment complémentaire simple brin.

Ces exemples démontrent que l'on peut obtenir facilement des fragments très longs (jusqu'à 20000 pb) en utilisant des amorces de type P' et que la portion simple brin demeure sous cette forme après la réaction d'amplification.

EXEMPLE 2 : Détection d'un acide nucléique cible ; mise en évidence de l'amplification de signal

15 Cible :

La cible est un ARN de 30 bases de long obtenu par transcription *in vitro* et dont la séquence est la suivante :

5' UUG CCU GGU CGU CCG GGU CCU UUC UUG GUG 3'.

20 On prépare des solutions diluées de 10 en 10. La solution non diluée est considérée comme étant la solution 1.

Méthode :

La détection de la cible se fait par hybridation sandwich en utilisant une sonde de capture fixée sur un microsupport et une sonde de détection qui est mise en évidence à l'aide d'un système de détection d'hybridation conforme à l'invention, soit à titre de comparaison, marquée avec une biotine.

30 La sonde de détection G4 (séquence : 5' GGT CGT CCT GGC AAT 3') est marquée par une biotine à son extrémité 5' selon le procédé décrit dans la Demande PCT WO/89/12462, ou bien additionnée d'une séquence supplémentaire (séquence I₁₅) à son extrémité 3'. La
35 séquence I₁₅ (5' ATC CGT TCT ACA GCC 3') s'hybride spécifiquement à un oligonucléotide (cI₁₅cJ₁₅) dont une

partie est complémentaire de I₁₅ et une partie est complémentaire de la séquence J₁₅. L'ensemble G4 I₁₅ + cI₁₅cJ₁₅ joue le rôle d'un adaptateur qui permet indirectement la liaison spécifique entre la sonde de
5 détection et le système amplificateur.

Système de détection d'hybridation :

Le système de détection d'hybridation est obtenu par amplification PCR d'un fragment d'ADN humain avec les amorces J₁₅(stop)₂H₁₂₁₇₀ et H₁₃₁₈₀ (voir exemple 1).
10 Le milieu réactionnel contient 0,1 µg d'ADN humain dans du tampon Taq 1X (CIS BIO INTERNATIONAL), avec 2,5 U de Taq DNA polymérase (CIS BIO INTERNATIONAL) et 6 pmoles de chacune des amorces. Les nucléotides triphosphates sont à 300 nM sauf le dTTP qui est à 240 nM. Le milieu
15 d'amplification contient en outre 60 nM de bio-16-dUTP (BOEHRINGER-MANNHEIM, France). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 94°C 5 min., puis 35 cycles, 94°C 1 min., 60°C 1 min. 30 et 70°C 1 min. 30 et une dernière élongation 5 min. à 70°C. On obtient ainsi
20 un fragment double brin de 1010 paires de bases dans lequel environ 1/5ème des thymidines sont remplacées par des uridines biotinylées.

L'amplification est contrôlée sur gel d'agarose 1%. On obtient une seule bande de taille
25 attendue. Le fragment est purifié sur colonne SEPHACRYL®HR (MICROSPIN™S400, PHARMACIA).

Hybridation sur puce :

La puce comporte 48 électrodes carrées de 50 µm de côté. Différents oligonucléotides, parmi
30 lesquels la sonde de capture Gc. La sonde de capture Gc (séquence : 5' CTC CAA GAA AGG ACC C 3'), sont fixés chacun sur une électrode par leur extrémité 5', par copolymérisation avec du pyrrole, selon le procédé décrit dans la Demande PCT WO/94/22889.

35 Les hybridations se déroulent en 1 heure à 45°C dans un tampon PBS 1 X, NaCl 0,5 M, EDTA 10 mM,

DENHARDT 2,5 X contenant 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng soniqué. Les solutions d'hybridation sont chauffées 3 min. à 80 °C dans des microtubes en présence de l'ARN à doser, puis transférées dans un sac
5 d'hybridation dans lequel est placée la puce.

Détection avec la sonde biotinylée :

L'hybridation de l'ARN cible sur la puce est effectuée dans 20 µl de tampon 1 X contenant 1 µl de la solution d'ARN à tester et 15 pmoles de sonde G4 marquée
10 à la biotine. On effectue ensuite 3 rinçages dans un tampon PBS 1 X, contenant 0,5 M NaCl et 0,05% de Tween 20. La puce est ensuite incubée 10 minutes dans une solution de streptavidine-phycoérythrine à 5 ng/µl dans PBS/NaCl/Tween, puis rincée dans le tampon de lavage.

15 La puce est montée sur lame et sous lamelle dans une goutte de tampon PBS/NaCl/Tween. Le signal est enregistré, après irradiation à 500-550 nm pendant 1 seconde, par un microscope couplé à une caméra CCD.

Le signal sur chaque électrode est quantifié
20 en unités arbitraires de fluorescence (UAFs) ; la gamme de signal est linéaire de 0 à 250 UAFs. Les résultats, exprimés en UAFs, sont illustrés par le Tableau I ci-après.

Détection avec le système de détection d'hybridation
25 conforme à l'invention :

Elle se déroule en 2 étapes.

a) hybridation avec l'adaptateur :

L'ARN à tester (1 µl) est d'abord hybridé sur la puce avec 25 pmoles de l'oligonucléotide I₁₅G₄ et 25
30 pmoles de l'oligonucléotide cI₁₅cJ₁₅. La puce est traitée 2 x 5 minutes dans une solution NaOH 0,1 N et rincée à l'eau distillée.

b) hybridation avec le système de détection d'hybridation :

Après un rapide rinçage dans le tampon PBS/NaCl/Tween, la puce est transférée dans un deuxième sac d'hybridation contenant 10 µl du système de détection d'hybridation purifié marqué à la biotine et 10 µl de
 5 tampon d'hybridation 2 X. Les rinçages, la révélation à la streptavidine-phycoérythrine, et l'enregistrement du signal sont effectués comme décrit ci-dessus.

Les signaux sont enregistrés après une irradiation de 1 seconde. Les résultats, exprimés en
 10 pixels, sont illustrés par le Tableau I ci-après.

TABLEAU I

Dilution d'ARN	1	1/10	1/100	0 (témoin sans ARN)
Marquage				
Biotine	80	37	18	10
Système de détection	250	250	220	10

Les électrodes comportant des sondes autres que G4 donnent des signaux entre 4 et 10 UAFs. Un signal de 250 UAFs correspond, dans les conditions utilisées, à
 15 une saturation du système de lecture.

On voit que le signal obtenu avec la sonde marquée par une seule biotine décroît très vite lorsque la dilution augmente, alors que l'utilisation du système de détection d'hybridation conforme à l'invention permet
 20 l'obtention d'un signal plus élevé, et en outre augmente nettement la sensibilité du test. Le bruit de fond en présence du système de détection d'hybridation ou de la sonde biotinylée est le même.

EXEMPLE 5 : Utilisation du système de détection d'hybridation conforme à l'invention pour la révélation sur microplaque.
 25

Le système amplificateur est constitué du fragment de 1010 bp marqué à la digoxigénine. Le protocole utilisé est le même que dans l'exemple 1. La
 30 digoxigénine est incorporée pendant la synthèse

enzymatique du système amplificateur en remplaçant 1/5 des dTTP par de la digoxigénine-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (BOEHRINGER-MANNHEIM).

Les résultats obtenus avec le système amplificateur sont comparés aux résultats obtenu après hybridation avec la sonde G4 marquée à la digoxigénine (oligonucléotide G4 marqué chimiquement à son extrémité 5' et purifié par HPLC, PHARMACIA). La cible est fixée sur une microplaque recouverte de streptavidine (LABSYSTEM) par l'intermédiaire de la sonde de capture Gc marquée à la biotine.

La cible est constituée d'ARN comme dans l'exemple précédent. On effectue des dilutions de la cible de 10 en 10.

15 Hybridation avec G4 DIG

l'ARN cible est incubé dans 50 µl de tampon PBS/NaCl contenant 30 pmoles de sonde G4 DIG et 40 pmoles de sonde de capture Gc marquée à la biotine. Les solutions sont chauffées 3 minutes à 80°C puis transférées dans les puits. On incube 1 heure à 42°C. Après 3 lavages avec le tampon PBS/NaCl/Tween, on incube pendant 1 heure à 37°C avec l'anticorps anti-DIG marqué à la peroxydase (solution mère à 75 U/ml, BOEHRINGER-MANNHEIM, diluée au 1/2000 dans du PBS/NaCl contenant 3% de BSA).

Hybridation avec le système de détection d'hybridation conforme à l'invention :

Elle se déroule en 2 étapes :

a) hybridation avec l'adaptateur :

L'ARN à tester est d'abord hybridé dans 50 µl de tampon PBS/NaCl/Tween contenant 40 pmoles de sonde Gc-biotine, 40 pmoles de I₁₅G4, et 40 pmoles de cI₁₅cJ₁₅. Les solutions sont dénaturées 3 minutes à 80°C puis transférées dans les puits de la microplaque. L'incubation se déroule 1 heure à 42°C. On effectue 3

lavages au PBS/NaCl/Tween puis on procède à l'incubation avec le système de détection d'hybridation

b) hybridation avec le système de détection d'hybridation :

- 5 On distribue dans chaque puits, 50 μ l de PBS/NaCl contenant 5 μ l de la solution purifiée de système de détection d'hybridation marqué à la digoxigénine, et 3% de BSA. Les microplaques sont incubées 1 heure à 42 °C. Après 3 lavages, on procède à
10 l'incubation pendant 1 heure à 37°C, avec l'anticorps anti-DIG dilué au 1/4000.

Révélation :

- Après 3 lavages, les puits sont incubés à l'obscurité, en présence de 50 μ l de substrat de la
15 peroxydase (O-phénylènediamine, dans un tampon citrate-phosphate, pH 5,5, contenant 0,02% H₂O₂). La réaction est arrêtée au bout de 10 minutes pour le système amplificateur et de 30 minutes pour les témoins, par
20 50 μ l d'acide oxalique 1 M. La densité optique est lue à 492 nm.

Les résultats, exprimés en unités de densité optique, sont rassemblés dans le Tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

ARN	dilution	1	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0
	μ l	5	1	1	1	1	1	1	1	0
Témoin		0,21	0,09	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05
Système de détection d'hybridation		NT	1,59	1,71	1,74	0,87	0,44	0,38	0,40	0,41

NT : non testé

- 25 On observe comme dans l'exemple précédent une très nette augmentation du signal et une très nette augmentation de la sensibilité du test après soustraction du bruit de fond.

REVENDICATIONS

1) Système de détection d'hybridation d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- un domaine de fixation A, constitué par un polynucléotide simple-brin ;

- un domaine intermédiaire B, constitué par au moins un synthon d'arrêt ; et

- un domaine de visualisation C, constitué par un polynucléotide double-brin, dans lequel est incorporé au moins un nucléotide marqué constituant un moyen de détection.

2) Système de détection d'hybridation selon la revendication 1 caractérisé en ce la taille du domaine A est comprise entre 8 et 40 nucléotides de long.

3) Système de détection d'hybridation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que au moins 1/50 des nucléotides constitutifs du domaine C sont des nucléotides marqués.

4) Système de détection d'hybridation selon une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la taille du domaine C est comprise entre 0,1 et 50 kb.

5) Procédé de préparation d'un système de détection d'hybridation selon une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel l'on effectue la synthèse d'au moins l'un des brins du domaine C à l'aide d'une polymérase dans un mélange réactionnel approprié, lequel procédé est caractérisé en ce que tout ou partie d'au moins l'un des nucléotides triphosphate dudit mélange réactionnel est remplacé par l'un de ses dérivés marqués, et en ce qu'il comprend au moins une étape a) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase, en présence d'un brin matrice, d'une amorce P' comprenant, de 5' en 3', un domaine A et un domaine B tels que définis dans la revendication 1, et un domaine X

constitué par une séquence capable de s'hybrider audit brin matrice pour amorcer la polymérisation.

6) Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape b) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase, en présence d'un brin matrice constitué par le produit d'élongation de l'amorce P', d'une seconde amorce P" comprenant une séquence capable de s'hybrider audit brin matrice pour amorcer la polymérisation.

7) Procédé selon une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape c) au cours de laquelle on effectue l'élongation par polymérase de l'amorce P', en présence d'un brin matrice constitué par le produit d'élongation de l'amorce P"

8) Procédé selon une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que les étapes b) et c) sont répétées jusqu'à obtention de la quantité souhaitée du système de détection d'hybridation.

9) Procédé selon une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le mélange réactionnel comprend plusieurs types d'amorces P' différant entre elles par la séquence du domaine A, et identiques entre elles en ce qui concerne la séquence du domaine X.

10) Nécessaire pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 5 à 10, comprenant au moins une amorce P' telle que définie dans la revendication 5, un polynucléotide utilisable comme matrice pour l'élongation de ladite amorce, et un nucléotide triphosphate marqué.

11) Nécessaire selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une amorce P".

12) Utilisation d'au moins un système de détection d'hybridation selon la revendication 1 pour la détection d'une séquence cible d'acide nucléique.

13) Utilisation selon la revendication 12 caractérisée en ce que pour détecter simultanément plusieurs séquences cibles, on utilise simultanément plusieurs systèmes de détection d'hybridation selon la revendication 1, différant entre eux par la séquence du domaine A.

14) Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que lesdits systèmes de détection d'hybridation diffèrent également entre eux par la séquence du domaine C et/ou par la nature des nucléotides marqués incorporés dans ledit domaine.

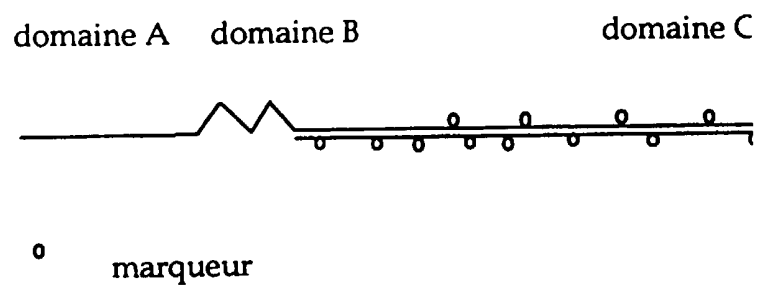
15) Utilisation selon une quelconque des revendications 12 à 14 caractérisée en ce que ladite séquence cible est fixée sur un support solide.

16) Utilisation selon la revendication 15 caractérisée en ce que ledit support solide comprend au moins une électrode.

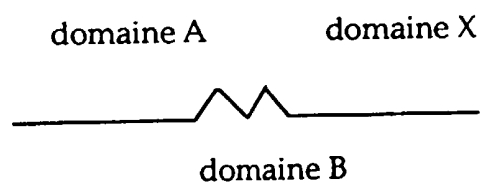
17) Utilisation selon la revendication 16 caractérisée en ce que ledit support solide est constitué par une pluralité d'électrodes, dont au moins 2 portent chacune une séquence cible différente.

18) Utilisation selon une quelconque des revendications 12 à 17, caractérisée en ce que l'on met en œuvre au moins un adaptateur intermédiaire d'hybridation, constitué par une molécule d'acide nucléique dont une partie peut s'hybrider spécifiquement avec le domaine A du système de détection d'hybridation, et une partie peut s'hybrider spécifiquement avec la séquence cible.

1/2

**FIGURE 1**

2/2

**FIGURE 2**

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 542284
FR 9704328

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,D Y	EP 0 416 817 A (ICI PLC) revendications et exemples	5-15,18 16,17
Y,D	--- NEWTON C. R. ET AL.,: "The production of PCR products with 5' single-stranded tails using primers that incorporate novel phosphoramidite intermediates" NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 21, no. 5, - 1993 pages 1155-1162, XP002052476 * le document en entier *	1-18
Y	--- EP 0 501 356 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) abstract, fig 1; exemple, col. 1	1-18
Y	--- WO 96 06946 A (IGEN INC) revendications en abstract	16,17
A	--- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 262 (C-608), 16 juin 1989 & JP 01 063398 A (WAKUNAGA PHARMACEUT CO LTD), 9 mars 1989, * abrégé *	1-18
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 janvier 1998		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 : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		