



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/19488 (43) Date de publication internationale: 1er septembre 1994 (01.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE94/00012 (22) Date de dépôt international: 18 février 1994 (18.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 09300161 19 février 1993 (19.02.93) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LA REGION WALLONNE [BE/BE]; Square du Bastion 1A, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GODFROID, Edmond [BE/BE]; Avenue de la Basilique 103/6, B-1080 Bruxelles (BE). BOLLEN, Alex [BE/BE]; Gaasbeekstraat 65, B-1701 Itterbeek (BE). (74) Mandataire: DE KEMMETER, François; Cabinet Bede, Place de l'Alma 3, B-1200 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: BORRELIA BURGENDORFERI SPIROCHAETE-SPECIFIC NUCLEIC ACID PROBES (54) Titre: SONDAS D'ACIDES NUCLEIQUES SPECIFIQUES AU SPIROCHETE BORRELIA BURGENDORFERI (57) Abstract An oligonucleotide agent for use in revealing at least one <i>Borrelia burgdorferi</i> strain. Sequences common to all <i>Borrelia burgdorferi</i> strain groups are provided for use as primers in polymerase chain reactions, as capture probes in a solid substrate hybridization test in which target DNA is "sandwiched" between the capture probe and a revelatory probe, or as revelatory probes in said solid substrate hybridization test. Sequences specific to each of the Bb strain groups are also provided for use as primers in polymerase chain reactions, or as revelatory or capture probes in the above-mentioned solid substrate hybridization test. (57) Abrégé L'invention concerne un agent oligonucléotidique utilisable pour la mise en évidence d'au moins une souche de <i>Borrelia burgdorferi</i>. On propose des séquences communes à tous les groupes de souches de <i>Borrelia burgdorferi</i>, utilisables soit comme amorces au cours de réactions d'amplification génétique, soit comme sondes de capture dans un test d'hybridation sur support solide où l'ADN cible est pris en "sandwich" entre cette sonde de capture et une sonde de révélation, soit comme sondes de révélation dans ce test d'hybridation sur support solide. On propose également des séquences spécifiques de chacun des groupes de souches de Bd, utilisables comme amorces au cours de réactions d'amplification génétique ou comme sondes de révélation ou de capture dans le test d'hybridation sur support solide évoqué ci-dessus.		

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	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

DESCRIPTION

Sondes d'acides nucléiques spécifiques au spirochète *Borrelia burgdorferi*

La présente invention concerne un agent oligonucléotidique utilisable pour la mise en évidence d'au moins une souche de *Borrelia burgdorferi* ainsi que les diverses applications dudit agent oligonucléotidique.

Le spirochète *Borrelia burgdorferi* (Bb) est l'agent causal de la maladie de Lyme. L'hôte vecteur de ce spirochète est un acarien du genre Ixodes, des espèces ricinus en Europe ou dammini et pacificus en Amérique du Nord. Le diagnostic clinique de la maladie repose sur différents signes anatomo-pathologiques (érythème chronique migrant, fièvre, arthrite, méningite et dans les cas les plus graves, myocardite) [1]. La recherche d'anticorps anti-OspA (glycoprotéine située à la surface de Bb) et/ou anti-flagelline (protéine du flagelle) constitue la méthode principale du diagnostic immuno-biochimique de cette maladie [2]. Cette recherche d'anticorps anti-Borrelia possède néanmoins un certain nombre d'inconvénients. Elle est dépendante de la réactivité du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis de Bb, déterminant la sensibilité de ce type de système de détection. Cette méthode immuno-biochimique possède également comme inconvénient de ne pas pouvoir dissocier une éventuelle réaction croisée avec des agents infectieux proches à Bb (par exemple, *Treponema pallidum* responsable de la syphilis) d'une reconnaissance spécifique [3]. Il est donc intéressant de développer de nouveaux outils diagnostiques qui contournent ces problèmes. La détection de l'ADN de Bb selon les méthodes d'hybridation moléculaire qui mettent en jeu une sonde nucléotidique et un ADN cible remplit ces conditions. Ces expériences d'hybridation sont généralement menées sur un support solide (filtre de nitrocellulose ou de nylon) où l'ADN cible est fixé, ou encore, en milieu liquide, par exemple, lors d'une réaction d'amplification génétique connue sous le nom de "Polymerase Chain Reaction" ou PCR nécessitant la présence de l'ADN cible, de deux sondes ou amorces nucléotidiques spécifiques à l'ADN cible et d'une enzyme de polymérisation appelée Taq

polymérase [4]. Ces méthodes d'hybridation moléculaire sont d'une grande sensibilité (possibilité de détecter un seul génome bactérien) et d'une grande spécificité. Elles ont l'avantage de ne pas dépendre d'une quelconque réaction physiologique ou pathologique de l'organisme hôte infecté.

5 Les études d'hybridation moléculaire sur génome entier de Bb ont permis de séparer en trois grands groupes, un grand nombre de souches connues [6]. Cette répartition en différents groupes est également mise en évidence en comparant la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de surface OspA de différentes souches de Bb par un programme informatique adapté. Les résultats de cette analyse informatique sont
10 corroborés par une étude phylogénétique menée sur le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S [5]. L'analyse de cette classification des souches de Bb en relation aux signes cliniques observés au cours de la maladie suggère un lien intéressant entre l'appartenance d'une souche à un groupe déterminé et la pathologie qui y est associée; par exemple, les souches reprises dans le groupe I montrent une propension à provoquer des signes
15 arthritiques tandis que celles appartenant au groupe II provoquent principalement des neuroborélioses [7].

La détection d'une infection par Bb se fait actuellement par la reconnaissance, par le sérum du patient potentiellement infecté, de l'antigène flagellaire purifié, fixé sur plaque de type Elisa. Cette reconnaissance est mise en évidence par
20 l'addition d'un anticorps anti-humain associé à une enzyme de révélation ou une molécule mettant en oeuvre ce type d'enzyme [8].

Dans le cadre des études épidémiologiques, du diagnostic en routine des infections par les différents groupes connus de Bb et du suivi de l'efficacité et de la composition des vaccins protecteurs des infections par Bb, il est utile de développer des
25 méthodes simples, spécifiques et sensibles basées sur l'emploi soit de sondes à ADN synthétique marquées de façon non isotopique utilisables dans des réactions d'hybridation moléculaire sur support solide, soit d'amorces d'ADN synthétique utilisables dans des réactions d'amplification génétique (PCR). A cet effet, nous avons identifié par traitement informatique, au sein de la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de surface OspA
30 de Bb, des régions susceptibles d'être utilisées comme sondes ou amorces dans des réactions d'hybridation moléculaire.

Un but de la présente invention est de proposer des séquences communes à tous les groupes de souches de Bb, utilisables soit comme amorces au cours de réactions d'amplification génétique (PCR), soit comme sonde de capture dans un test
35 d'hybridation sur support solide où l'ADN cible est pris en "sandwich" entre cette sonde de

capture et une sonde de révélation, soit comme sondes de révélation dans ce test d'hybridation sur support solide.

Un autre but de la présente invention est de proposer des séquences spécifiques de chacun des groupes de souches de Bb, utilisables comme amorces au cours de réactions d'amplification génétique (PCR) ou comme sondes de révélation ou de capture dans le test d'hybridation sur support solide évoqué ci-dessus.

Ces différents buts sont atteints au moyen d'un agent oligonucléotidique tel que défini dans la revendication principale.

Parmi les séquences qui y sont définies, on distingue les séquences communes à tous les groupes de souches de *Borrelia burgdorferi* et les séquences spécifiques de groupes.

1. Séquence communes à tous les groupes de souches de *Borrelia burgdorferi*.

A. Utilisables au cours de réactions d'amplification génétique (PCR).

La présente invention a donc pour objet des amorces d'acides nucléiques utilisables pour l'amplification génétique de l'ADN de tous les groupes de souches connues de Bb. La comparaison de la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de surface OspA, par un programme informatique adapté, permet de cibler ce type d'amorces.

La réaction PCR nécessite l'utilisation de 2 amorces d'acides nucléiques. L'une est située sur le brin codant; l'autre se situe sur le brin complémentaire en aval de la première amorce. Le tableau 1, ci-dessous, présente la séquence de 2 paires d'amorces permettant l'amplification d'un fragment d'ADN au sein de la séquence du gène OspA de tous les groupes de souches Bb. Ce tableau présente également la position de ces amorces sur la séquence connue du gène OspA de la souche B31, leur température de demi-hybridation et leur taille respective.

A, T, C, G représentent les nucléotides correspondant aux bases adénine, thymine, cytosine et guanine, respectivement.

Tableau 1

Sondes	Séquences	Long.	Tm	Position
OspApc1	AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGC	27	70°C	21 - 47
OspApc2	CTAGTGTTTT GCCATCTTCT TTGAAAA	27	70°C	328 - 302

Les séquences dans ce tableau sont présentées dans l'orientation 5'→3'.

- 5 La séquence de l'amorce OspApc2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence du brin codant (ou de la fibre directe).

L'utilisation des amorces OspApc1/OspApc2 dans une réaction PCR génère un fragment d'ADN de 282 paires de bases (pb).

- 10 **B. Utilisables pour la capture de l'ADN issu de tous les groupes de souches de *Borrelia burgdorferi*.**

- 15 La présente invention a également pour objet une séquence commune à tous les groupes de souches de Bb utilisables pour la "capture" de l'ADN issu de tous ces groupes dans un test, dit de sandwich, où des sondes oligonucléotidiques spécifiques à chacun des groupes ou communes à tous les groupes de souches de Bb servent à la révélation de l'hybride moléculaire sonde de "capture" - ADN de Bb. Une telle sonde de "capture" peut être fixée par un lien covalent à un support adéquat. Dans un tel système, l'ADN cible est pris en sandwich entre l'oligonucléotide de capture et la sonde de révélation.

- 20 La séquence de cet oligonucléotide de capture commun à tous les groupes de souches de Bb a pu être définie par comparaison informatique des séquences du gène codant pour la glycoprotéine de surface OspA. La séquence de cet oligonucléotide est la suivante:

- 25 Bb50: 5'-ATGAAAAAAT ATTTATTGGG AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGCATG-3'

La séquence de cet oligomère comprend 50 nucléotides; elle se situe sur le brin codant du gène OspA et s'étend de la position 1 à 50 de la séquence codante du gène OspA de la souche B31.

C. Utilisables pour la révélation d'une réaction d'hybridation entre la sonde de capture et l'ADN cible.

La présente invention a également pour objet des sondes utilisables pour l'identification de l'espèce Bb par rapport aux autres bactéries. Ces sondes oligonucléotidiques communes à tous les groupes de souches de Bb permettent de révéler dans un test d'hybridation, tel qu'il est décrit ci-dessus au point 1.B, la présence d'un hybride moléculaire constitué par la sonde de capture et l'ADN cible.

Ces sondes de révélation sont modifiées chimiquement par l'addition en 5' et/ou en 3' d'un ou plusieurs groupement(s) moléculaire(s) ayant une affinité pour une molécule associée à une enzyme, par exemple, la phosphatase alcaline. Cette enzyme peut réagir soit avec un substrat chromogénique incolore et soluble donnant un produit de réaction coloré ou un substrat chéniluminescent, par exemple l'AMPPDTM ou le CSPDTM (Tropix, USA).

Ces sondes de révélation comprennent une séquence d'acides nucléiques qui est la suivante:

- pour l'oligomère Bb35bio:

5'-GCAACAGTAG ACAAGCTTGA GCTTAAAGGA ACTTC-3'

- pour l'oligomère Bb23bio:

5'-TTTTCAAAGA AGATGGCAAA ACA-3'

Les oligomères Bb35bio et Bb23bio, communs à tous les groupes de souches de Bb comprennent respectivement 35 et 23 monomères. Leur séquence s'étend respectivement de la position 166 à 200 et de la position 302 à 324 de la séquence codante du gène OspA de la souche B31.

2. Séquences spécifiques de groupes.

A. Utilisables au cours de réaction d'amplification génétique (PCR).

5 La présente invention a aussi pour objet des amorces spécifiques de chacun des groupes de souches de Bb utilisables dans une réaction PCR. Les amorces de type I, notées BbGI1 et BbGI2, permettent l'amplification d'un fragment d'ADN caractéristique des souches de ce groupe. Les amorces des groupes II, symbolisées par BbGII1 et BbGII2, permettent l'amplification d'un fragment d'ADN caractéristique du groupe II
10 tandis que les amorces du groupe III, symbolisées par BbGIII1, BbGIII2 et BbGIII3, permettent lorsqu'elles sont combinées par paire, par exemple BbGIII1 et BbGIII2, l'amplification d'un fragment d'ADN caractéristique des souches du groupe III.

La séquence de ces amorces spécifiques de groupes, présentée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', est la suivante:

15 – pour les souches du groupe I, les amorces:

BbGI1: 5'-AACAAAGACG GCAAGTACGA TCTAATT-3'

BbGI2: 5'-TTACAGTAAT TGTTAAAGTT GAAGTGCC-3'

20 – pour les souches du groupe II, les amorces:

BbGII1: 5'-TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC-3'

BbGII2: 5'-GTAAC TTTC A ATGTTGTTTT GCCG-3'

25 – pour les souches du groupe III, les amorces:

BbGIII1: 5'-GAAAAAGGTG AATTGTCTGC AAAAACC-3'

BbGIII2: 5'-TTCCAATGTT ACTTTATCAT TAGCTACTT-3'

BbGIII3: 5'-TAAAGACAAA ACATCAACAG ATGAAATG-3'

30

Les oligomères BbGI1 et BbGI2 débutent respectivement à la position 139 et 682 sur la séquence codante du gène *OspA* de la souche B31 (souche du groupe I). Ils sont constitués respectivement de 27 et 28 nucléotides. Leur température de demi-hybridation est de 74°C. L'oligomère BbGI2 est présenté en mode complémentaire inverse

au brin codant. L'utilisation de ces deux oligomères dans une réaction PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 544 paires de bases (pb).

Les oligomères BbGII1 et BbGII2 débutent respectivement à la position 201 et 545 sur la séquence codante du gène OspA de la souche B29 (souche du groupe II).

5 Ils sont constitués tous deux de 24 nucléotides. Leur température de demi-hybridation est de 66°C. L'oligomère BbGII2 est présenté en mode complémentaire inverse au brin codant. L'utilisation de ces deux oligomères dans une réaction PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 345 paires de bases (pb).

Les oligomères BbGIII1, BbGIII2 et BbGIII3 débutent respectivement à la
10 position 381, 536 et 347 sur la séquence codante du gène OspA de la souche Acal (souche du groupe III). Ils sont constitués respectivement de 27, 29 et 28 nucléotides. La température de demi-hybridation est de 74°C pour les oligomères BbGIII1 et BbGIII2, et de 72°C pour l'oligomère BbGIII3. L'oligomère BbGIII2 est présenté en mode complémentaire inverse au brin codant. L'utilisation des oligomères BbGIII1 et BbGIII2 dans une réaction
15 PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 155 paires de bases (pb). La paire d'oligomères BbGIII3/BbGIII2 génère après amplification un fragment d'ADN de 188 pb.

B. Utilisables pour la détection directe ou indirecte, lors d'une réaction d'hybridation ADN/ADN, des différents groupes de souches de *Borrelia burgdorferi*.

20

La présente invention a aussi pour objet des sondes d'acides nucléiques spécifiques à chacun des groupes de souches de Bb utilisables pour la détection directe ou indirecte des différents groupes de souches de Bb. La détection directe peut se faire par hybridation de l'ADN cible fixé sur un support solide, par exemple: la nitrocellulose ou le
25 nylon, par une de ces sondes appartenant à un des groupes connus de souche de Bb. La détection indirecte peut se faire via le système d'hybridation moléculaire "sandwich" exposé au point 1.B. Dans ce cas, la sonde de capture peut être soit une sonde commune à tous les groupes de souches de Bb soit une sonde spécifique à chacun des groupes. De telles sondes de "capture" peuvent être également fixées par un lien covalent à un support
30 adéquat. Dans ce test de "sandwich", les oligonucléotides de révélation seront soit l'oligomère Bb35bio ou Bb23bio lorsque la sonde de capture est spécifique à chacun des groupes de Bb, soit l'oligomère BbGI23, BbGII23 ou BbGIII28 lorsque la sonde de capture est commune à tous les groupes de Bb. Ces sondes sont associées à une molécule ayant une affinité pour une molécule associée à une enzyme, par exemple, la phosphatase

alcaline. De même, dans un système de détection directe, les sondes sont modifiées comme décrit ci-dessus.

La séquence présentée dans le sens 5'-3', de ces oligomères est la suivante:

- 5 - pour le groupe I, l'oligomère BbGI23:

5'-CTGCAGCTTG GAATTCAGGC ACT-3'

- 10 - pour le groupe II, l'oligomère BbGII23:

5'-ACTCTAGCTG CTGACGGCAA AAC-3'

- 15 - pour le groupe III, l'oligomère BbGIII28:

5'-AGGAAAAGTA GCTAATGATA AAGTAACA-3'

L'oligomère BbGI23 commence à la position 638 pour se terminer à la position 660 de la séquence codante du gène OspA de la souche B31 (souche du groupe I). Il est constitué de 23 nucléotides. Sa température de demi-hybridation est de 70°C.

- 20 L'oligomère BbGII23 commence à la position 508 pour se terminer à la position 530 de la séquence codante du gène OspA de la souche B29 (souche du groupe II). Il est constitué de 23 nucléotides. Sa température de demi-hybridation est de 70°C.

- 25 L'oligomère BbGIII28 commence à la position 503 pour se terminer à la position 530 de la séquence codante du gène OspA de la souche Acal (souche du groupe III). Il est constitué de 28 nucléotides. Sa température de demi-hybridation est de 70°C.

Ci-après on donne quelques exemples d'applications des agents oligonucléotidiques décrits.

30 **A. Diagnostic de *Borrelia burgdorferi* (Bb) dans les liquides biologiques des sujets infectés.**

- 35 Le spirochète Bb infecte l'animal hôte suite à une morsure par une tique (*Ixodes ricinus*, pour l'Europe) infectée. A l'endroit de la morsure, il se développe rapidement (quelques heures) un érythème annulaire et puis un érythème chronique migrant. Le

spirochète s'installe ensuite dans différents organes et tissus de l'hôte (vessie, système nerveux central, tissus cartilagineux) après avoir transité par le sang et le foie. Il est donc intéressant d'analyser par un système de détection approprié (PCR avec amorces originales spécifiques à Bb ou test d'hybridation en "sandwich" avec sondes nucléotidiques originales spécifiques à Bb) les liquides biologiques qui peuvent être potentiellement infectés par Bb suite à une morsure par une tique. Le sang et les urines constituent des liquides de choix vu la facilité avec laquelle ils sont prélevés. Lorsque des signes articulaires (arthrite) ou neurologiques apparaissent, il est intéressant d'utiliser ces systèmes originaux d'investigation moléculaire sur les liquides synovial et céphalo-rachidien.

10

B. Applications humaine et vétérinaire.

L'utilisation de notre système de détection, basée sur des sondes et/ou amorces moléculaires spécifiques à Bb, à des échantillons humains est démontrée au point 3.A., développé ci-dessus. Ce système de détection peut être étendu à des échantillons d'origine animale. Les chats, les chiens, les bovidés et les équidés peuvent être des animaux hôtes de Bb. La boiterie du cheval peut trouver son origine par l'infection de l'articulation tibio-tarsienne par Bb. Certains auteurs ont montré la présence de Bb dans le lait de vache. Il est donc intéressant d'utiliser le système de détection que nous proposons sur des échantillons d'origine vétérinaire qui seraient potentiellement infectés par Bb.

20

C. Aide à la thérapeutique de l'infection.

Les études d'hybridation moléculaire entre génome entier de Bb ont permis de séparer un grand nombre de souches connues en 3 grands groupes. La comparaison informatique de la séquence connue du gène OspA de plusieurs souches de Bb a également mis en évidence la ségrégation de ces différentes souches de Bb en 3 grands groupes. L'analyse de cette classification des souches de Bb en relation aux signes cliniques observés au cours de la maladie montre un lien intéressant entre l'appartenance d'une souche à un groupe déterminé et la pathologie qui y est associée; par exemple, les souches reprises dans le groupe I montrent une propension à provoquer des signes arthritiques tandis que celles appartenant au groupe II provoquent principalement des neuroborélioses. Les souches du groupe III, quant à elles, provoquent essentiellement des acrodermatites.

30

La relation entre l'appartenance à un groupe et une pathologie spécifique développée au cours de stades plus avancés de la maladie est une notion importante pour le clinicien. Celui-ci adaptera sa médication (type d'antibiotique, posologie, durée du traitement) en fonction de différents résultats qu'il aura engrangé lors de l'analyse des symptômes et de l'étude biochimique des différents liquides biologiques prélevés. La détection rapide, spécifique et fiable du groupe de Bb infectant le patient à des stades précoces de la maladie donnera une indication précieuse au clinicien quant au type d'évolution auquel il peut s'attendre si la médication n'a pas les effets désirés. Cette réponse diagnostique permettra au clinicien d'adapter son traitement afin d'éviter une évolution de la maladie vers des stades plus préoccupants du point de vue clinique (atteinte neurologique et cardiaque, chronicité de la maladie). L'utilisation de notre système de détection, basée sur des sondes et/ou amorces moléculaires originales, spécifiques à chacun des groupes de souches de Bb, permet de rencontrer cet objectif.

D. Epidémiologie et étude des animaux réservoirs.

Une étude épidémiologique de la maladie de Lyme comporte deux aspects: l'un, comprend une étude du vecteur de la maladie, *Ixodes ricinus*; l'autre, comprend l'analyse des animaux réservoirs (sauvages et domestiques). Le vecteur de cette maladie est un acarien (*Ixodes ricinus*) qui se développe dans des sous-bois à haute teneur en humidité en trois stades: larve, nymphe et adulte. A chaque phase de développement, *Ixodes ricinus* réalise un repas sanguin au cours duquel il peut s'infecter s'il est en contact avec un animal contaminé par Bb. L'animal sauvage hôte, par excellence, de Bb est le chevreuil en raison de la superposition du biotope du chevreuil à celui de la tique. Néanmoins, les animaux sauvages hôtes, réservoirs potentiels de la maladie, sont très divers. Ils peuvent être des rongeurs (rat des champs, lièvre, lapin,...), des oiseaux (merle, moineau,...), des suidés (sanglier), des cervidés (chevreuil, daim, cerf) ou encore des canidés (loup, renard).

Une étude épidémiologique du vecteur de Bb et des animaux sauvages cités ci-dessus permettra non seulement de définir les zones géographiques à haut risque d'infection, mais aussi de mesurer le degré d'infection des trois stades de développement du vecteur et des animaux sauvages, réservoirs potentiels du spirochète. La méthode de détection, telle que nous la proposons, basée sur l'hybridation moléculaire entre l'ADN cible et une sonde ou une paire d'amorces originale, spécifique à Bb permet d'assurer ce type d'objectif.

E. Suivi de l'efficacité de la vaccination.

La vaccination de patients vivant dans des régions géographiques à haute endémicité de Bb ou de patients qui par leur activité (garde-chasse, garde-forestier, agriculteur, promeneur) côtoient ces régions constitue la méthode prophylactique permettant d'éviter les signes cliniques douloureux et invalidants associés à la maladie de Lyme. Néanmoins, un certain nombre de patients peuvent échapper à la protection ciblée par le vaccin. Il est donc intéressant de suivre l'efficacité des vaccins proposés par la détection de Bb chez les patients vaccinés présentant des signes cliniques associés à la maladie de Lyme. La méthode de détection, telle que nous la proposons, basée sur l'hybridation moléculaire entre l'ADN cible et une sonde, ou une paire d'amorces originale, spécifique à Bb permet d'assurer ce type d'objectif.

F. Suivi de la composition des vaccins.

La validité d'un vaccin est déterminée par son pouvoir de protection vis-à-vis de l'agent pathogène cible. Dans le cas spécifique de Bb, le vaccin peut être développé en essayant de dresser une immunité contre la glycoprotéine de surface OspA. Une bonne connaissance de la séquence de ce gène provenant d'un grand nombre de souches différentes appartenant à des groupes différents aide à l'édification d'un tel type de vaccin. Un certain nombre d'auteurs ont indiqué une variabilité du gène OspA. La raison de cette variabilité n'est pas encore connue.

La variabilité du répertoire génétique général de Bb, la variabilité de la séquence du gène OspA et l'état de la connaissance des différentes souches de Bb nécessite une haute vigilance quant à la construction de ce type de vaccin. L'analyse d'un grand nombre d'isolats différents selon les méthodes originales d'investigation moléculaire telles que nous le proposons permet de déterminer le champs d'application de ce type de vaccin. L'utilisation combinée de sondes originales (ou paires d'amorces) spécifiques à chacun ou à tous les groupes de souches de Bb permettra de classer les isolats étudiés dans un des groupes connus dans l'état actuel de la connaissance ou de la positionner dans un des nouveaux groupes créés à cet effet.

L'invention sera maintenant décrite plus concrètement dans les exemples qui suivent:

Exemple 1.**A. Détermination des séquences oligonucléotidiques communes à tous les groupes de *Borrelia burgdorferi*.**

5

Un des buts de la présente invention est de proposer des séquences communes à tous les groupes de souches de Bb, utilisables soit comme amorces au cours de réactions PCR, soit comme sonde de capture dans un test d'hybridation sur support solide où l'ADN cible est pris en "sandwich" entre cette sonde de capture et une sonde de
10 révélation, soit comme sondes de révélation dans ce test d'hybridation de type "sandwich" ou dans un test de détection directe.

L'utilisation des programmes de comparaison de séquences ("Pileup" et "Pretty") distribués par le Genetics Computer Groups, Inc. (University Research Park, 575 Science Drive, Suite B, Madison, Wisconsin 53711, USA) permet de caractériser ce type de
15 séquence. Le programme informatique "Pileup" permet l'alignement de plus de 300 séquences dont la longueur peut atteindre 5.000 nucléotides. Ce programme dérive d'une méthode d'alignement progressif développée par Feng et Doolittle [9]. Le programme "Pretty" conduit à l'alignement des séquences étudiées et à la création d'une séquence
20 "consensus" à partir de cet alignement. A partir de ce mode de présentation des séquences étudiées, il est possible de déterminer rapidement et aisément les séquences cibles communes à tous les groupes de souches de Bb qui peuvent jouer le rôle d'amorces dans une réaction PCR, de sondes dans un système de détection directe ou indirecte ou encore de sonde de capture dans un test d'hybridation de type "sandwich". Ces séquences
nucléotidiques possèdent une très haute homologie avec la séquence cible.

25

Les séquences oligonucléotidiques utilisables comme sondes communes à tous les groupes de souches de Bb sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous. La séquence de ces oligomères, orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', se situe sur le brin codant du gène OspA de la souche B31.

Tableau 2

Sondes	Séquences	Taille	Position
Bb50	ATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGGTCTAATATTA GCCTTAATAGCATG	50	1 - 50
Bb35bio	GCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTC	35	166 - 200
Bb23bio	TTTCAAAGA AGATGGCAAA ACA	23	302 - 324

Les séquences oligonucléotidiques utilisables comme amorces communes à tous les groupes de souches de Bb, la longueur de ces amorces, leur température de demi-hybridation (T_m) et leur position par rapport à la séquence codante du gène OspA de la souche B31 sont présentées dans le tableau 3 ci-dessous. La séquence de ces oligomères, orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', se situe sur le brin codant pour l'amorce OspApc1; elle se situe sur le brin non codant pour l'amorce OspApc2. La séquence de l'oligomère OspApc2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence située sur le brin codant.

Tableau 3

Sondes	Séquences	Long.	T _m	Position
OspApc1	AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGC	27	70°C	21 - 47
OspApc2	CTAGTGTTTT GCCATCTTCT TTGAAAA	27	70°C	328 - 302

Les séquences dans ces sondes ou amorces présentent un très haut pourcentage d'homologie aux séquences connues du gène OspA de toutes les souches de Bb. Ce haut pourcentage d'homologie (98-100%) garantit des hybridations ou amplifications hautement spécifiques à toutes les souches de Bb.

B. Détermination de séquences d'ADN spécifiques à chaque groupe de souches de *Borrelia burgdorferi*.

Un autre but de la présente invention est de proposer des séquences nucléotidiques spécifiques à chaque groupe de souches de Bb, utilisables soit comme amorces au cours d'une réaction d'amplification génétique (PCR), soit comme sonde de révélation ou de capture dans un test d'hybridation de type "sandwich" ou dans un test de détection directe.

Le traitement informatique ("Pileup" et "Pretty") des séquences disponibles du gène *OspA* des différentes souches de Bb permet de déterminer aisément les séquences susceptibles d'être utilisées comme sonde ou amorce spécifique à chacun des groupes connus de souches de Bb.

Les séquences oligonucléotidiques de telles sondes, leur position, leur longueur et leur température de demi-hybridation sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous. La position des oligomères BbGI23, BbGII23 et BbGIII28 se situe respectivement sur le brin codant du gène *OspA* de la souche B31, B29 et Acal.

Tableau 4

Sondes	Séquences	Position	Taille	Tm
BbGI23	CTGCAGCTTGGAATTCAGGCACT	638 - 660	23	70°C
BbGII23	ACTCTAGCTGCTGACGGCAAAAC	508 - 530	23	70°C
BbGIII28	AGGAAAAGTAGCTAATGATAAAGTAACA	503 - 530	28	70°C

20

Les séquences oligonucléotidiques des amorces spécifiques à chacun des groupes de souches de Bb, leur position, leur taille et leur température de demi-hybridation sont présentées dans le tableau 5 ci-dessous. Les séquences de telles amorces sont orientées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La position des oligomères BbGI1 et BbGI2 se réfère au brin codant du gène *OspA* de la souche B31 (groupe I); celle des oligomères BbGII1 et BbGII2 se réfère à la séquence codante du gène *OspA* de la souche B29 (groupe II); et enfin, celle des oligomères BbGIII1, BbGIII2 et BbGIII3 se rapporte à la

25

séquence codante du gène *OspA* de la souche Acal (groupe III). Les séquences des oligomères BbGI2, BbGII2 et BbGIII2 sont présentées en mode complémentaire inverse à la séquence située sur le brin codant.

5 Tableau 5

Amorces	Séquences	Position	Taille	Tm
BbGI1	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	139 - 165	27	74°C
BbGI2	TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC	682 - 655	28	74°C
BbGII1	TGATAAAAACAACGGTCTGGAAC	201 - 224	24	66°C
BbGII2	GTAAC TTCAATGTTGTTTGCCG	545 - 522	24	66°C
BbGIII1	GAAAAAGGTGAATTGTCTGCAAAAACC	381 - 407	27	74°C
BbGIII2	TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT	536 - 508	29	74°C
BbGIII3	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG	347 - 374	28	72°C

Les séquences de ces sondes ou amorces spécifiques de groupe présentent une homologie à 100% aux séquences connues du gène *OspA* des groupes cibles de souches de Bb. Ce haut pourcentage d'homologie garantit des hybridations ou amplifications hautement spécifiques aux différents groupes de souches de Bb.

Exemple 2.

Vérification expérimentale de la qualité des séquences communes à tous les groupes de *Borrelia burgdorferi*.

5

A. Hybridation de la sonde Bb23bio à l'ADN de 3 souches représentatives des différents groupes connus de souches Bb.

L'ADN des souches B31 (groupe I), ZQ1 (groupe II) et Acal (groupe III) a
10 été préparé selon les méthodes développées par Lefebvre et coll. [10] et par Simpson et coll. [11]. Des quantités variables (de 1 µg à 100 ng) d'ADN issus de ces 3 souches (B31, ZQ1 et Acal) ont été déposées sur membrane de nylon (Hybond N, Amersham) en utilisant l'appareil Bio-Dot^R fourni par la Société BioRad. Les ADN ont été ensuite fixés à la membrane par un traitement de 3 minutes aux ultraviolets (longueur d'onde: 254 nm). La
15 membrane a été pré-hybridée et hybridée selon le protocole présenté par la Société Tropic (Tropic Inc., 47 Wiggins Avenue, Bedford, Massachussets 01730, USA). Ce protocole comprend une incubation de la membrane pendant 1 heure à la température de 37°C dans une solution d'hybridation (1mM EDTA, 7% (P/V) SDS, 0,25 M phosphate disodique, pH7,2, 1% I-BlockTM). La membrane est ensuite hybridée dans cette solution pendant 1 nuit à la
20 température de 42°C en présence de la sonde Bb23bio à la concentration de 50 ng par ml de solution d'hybridation. La sonde Bb23bio a été modifiée chimiquement par l'addition d'une molécule, par exemple, la biotine, ayant une affinité pour un complexe moléculaire constitué d'une partie enzymatique, par exemple, la phosphatase alcaline.

Après l'hybridation, la membrane a été lavée successivement par des
25 solutions composées soit de 2*SSC/SDS 1% (0,3 M Sodium citrate/0,03 M Sodium chloride/1% sodium dodecylsulfate); soit de 1*SSC/SDS 1%; et enfin, soit de 1*SSC. Chaque lavage a été réalisé à la température de 42°C pendant 2*10 minutes.

Les hybrides moléculaires, ADN cible-sonde, ont été détectés par
chimiluminescence tel qu'il est décrit dans le protocole d'utilisation du système de détection
30 "Southern-LightTM, Chemiluminescent Detection System" développé par la Société Tropic.

Il résulte que la sonde Bb23bio reconnaît l'ADN des 3 souches analysées (B31, ZQ1 et Acal). La sensibilité du système permet la détection de ± 100 ng d'ADN (équivalent à $100 \cdot 10^6$ copies d'ADN de *Borrelia burgdorferi*).

B. Amplification génétique (PCR) de fragments d'ADN caractéristiques à tous les groupes connus de souches de Bb par les amorces OspApc1 et OspApc2.

La présente invention a également pour objet des amorces
5 oligonucléotidiques utilisables pour l'amplification de fragments d'ADN caractéristiques à toutes les souches de Bb. Les amorces OspApc1 et OspApc2 permettent d'amplifier un fragment d'ADN de 282 paires de bases caractéristiques à toutes les souches de Bb. Pour obtenir ce fragment d'ADN, la réaction d'amplification génétique est réalisée sur 100 ng d'ADN préparé selon les méthodes développées par Lefebvre et coll. [9] et par Simpson et
10 coll. [10]. Cette réaction PCR est menée en deux phases:

- une phase de dénaturation, de l'ADN cible, de 10 minutes à 96°C.
- une phase d'amplification comprenant 3 étapes répétées 35 fois. La première étape permet l'hybridation des amorces à l'ADN cible; la deuxième étape réalisée à 72°C assure la synthèse d'un ADN complémentaire à l'ADN cible par l'utilisation de l'enzyme
15 de polymérisation, la Taq polymérase; et enfin, la troisième étape permet la dissociation des hybrides formés au cours des deux premières étapes.

Dans le cadre d'utilisation des amorces OspApc1 et OspApc2 dans ce type de réaction, l'étape d'hybridation a été menée à 60°C pendant 1 minute, celle de polymérisation a été réalisée à 72°C pendant 2 minutes et l'étape de dissociation des
20 hybrides a été accomplie à 94°C pendant 1 minute.

Les ADNs de 3 souches (B31, ZQ1 et Acal) représentatives de chacun des groupes de souches de Bb ont été analysés selon la méthode PCR indiquée ci-dessus. Un dixième de la réaction PCR a été analysé sur gel d'agarose contenant du Nusieve à 3% et du SeaKem à 1%. Il résulte qu'un fragment de 282 paires de bases est obtenu pour les 3
25 souches analysées après électrophorèse, coloration du gel au bromure d'éthidium et visualisation sur un transilluminateur U.V. Ceci indique la bonne qualité des amorces OspApc1 et OspApc2 à être utilisées dans une réaction PCR ainsi que leur possibilité de reconnaître des souches appartenant aux 3 groupes connus de souches de Bb.

Exemple 3.

Vérification expérimentale de la qualité des séquences spécifiques à chacun des groupes connus de souches de *Borrelia burgdorferi*.

5

A. Hybridation des sondes spécifiques de groupes (BbGI23, BbGII23 et BbGIII28) à l'ADN de 3 souches représentatives des différents groupes connus de souches de Bb.

10

La procédure de préparation de l'ADN de 3 souches représentatives des différents groupes connus de souches (B31 pour le groupe I, ZQ1 pour le groupe II et Acal pour le groupe III) de Bb et la mise en évidence des hybrides moléculaires, ADN cible-sonde (BbGI23 ou BbGII23 ou BbGIII28) ont été menées dans des conditions identiques à celles développées dans le test d'hybridation directe mis au point pour les sondes communes à tous les groupes connus de souches de Bb (voir Exemple 2 - point A).

15

Il résulte à la suite de ces procédures expérimentales que la sonde BbGI23 caractéristique des souches du groupe I reconnaît spécifiquement l'ADN de la souche B31 (souche du groupe I) à la température d'hybridation de 45°C-50°C. A cette température d'hybridation, la sonde BbGI23 ne reconnaît pas l'ADN issu des souches ZQ1 (groupe II) et Acal (groupe III).

20

Il résulte aussi que la sonde BbGII23 caractéristique des souches du groupe II reconnaît spécifiquement l'ADN de la souche ZQ1 (souche du groupe II) à la température d'hybridation de 45°C-50°C. A cette température d'hybridation, la sonde BbGII23 ne reconnaît pas l'ADN issu des souches B31 (groupe I) et Acal (groupe III).

25

Il résulte également à la suite de ces procédures expérimentales que la sonde BbGIII28 caractéristique des souches du groupe III reconnaît spécifiquement l'ADN de la souche Acal (souche du groupe III) à la température d'hybridation de 45°C-50°C. A cette température d'hybridation, la sonde BbGIII28 ne reconnaît pas l'ADN issu des souches B31 (groupe I) et ZQ1 (groupe II).

30

L'ensemble de ces résultats est repris dans le tableau 6 ci-dessous:

Tableau 6

Sondes	B31	ZQ1	Acal
BbGI23	+	-	-
BbGII23	-	+	-
BbGIII28	-	-	+

B. Amplification génétique (PCR) de fragments d'ADN spécifiques à chacun des groupes connus de souches de Bb.

La présente invention a également pour objet des amorces
5 oligonucléotidiques utilisables pour l'amplification de fragments d'ADN spécifiques de
chacun des groupes connus de souches de Bb. Les amorces BbGI1 et BbGI2 permettent
d'amplifier un fragment d'ADN de 544 paires de bases; l'utilisation des oligomères BbGII1 et
BbGII2 permet une amplification d'un fragment d'ADN de 345 paires de bases; la paire
d'oligomères BbGIII3 et BbGIII2 génère après amplification un fragment d'ADN de 188 pb.
10 Pour obtenir ces fragments d'ADN, la réaction d'amplification génétique est réalisée sur
100 ng d'ADN, à partir de différentes souches (B31, ZQ1 et Acal) représentatives des
différents groupes connus de souches de Bb. L'ADN de ces souches est préparé selon les
méthodes décrites dans l'exemple 2 point A. La réaction PCR a été menée en deux phases
telles qu'elles sont décrites dans l'exemple 2 point B, avec la différence que la température
15 d'hybridation pour la paire GI1/GI2 a été de 69°C; pour la paire GII1/GII2, cette température
d'hybridation a été de 68°C; et enfin, pour la paire GIII2/GIII3, la température d'hybridation a
été de 68°C.

L'analyse des produits de réaction PCR par gel d'électrophorèse indique
que la paire GI1/GI2 spécifique des souches du groupe I permet, à la température de 69°C,
20 l'amplification d'un fragment d'ADN de 544 paires de bases uniquement à partir d'ADN issu
de la souche B31 (groupe I). L'utilisation de cette paire d'amorces en présence d'ADN issu
des souches ZQ1 (groupe II) et Acal (groupe III) ne permet pas l'amplification de ce fragment
de 544 paires de bases.

Cette analyse indique également que la paire GII1/GII2 spécifique des
25 souches du groupe II permet, à la température de 68°C, l'amplification d'un fragment d'ADN
de 345 paires de bases uniquement à partir d'ADN issu de la souche ZQ1 (souche du
groupe II). L'utilisation de cette paire d'amorces en présence d'ADN issu des souches B31
(groupe I) et Acal (groupe III) ne permet pas l'amplification de ce fragment de 345 paires de
bases.

30 Il résulte aussi que la paire GIII3/GII2 spécifique des souches du groupe
III permet, à la température de 70°C, l'amplification d'un fragment d'ADN de 188 paires de
bases uniquement à partir d'ADN issu de la souche Acal (souche du groupe III). L'utilisation
de cette paire d'amorces en présence d'ADN issu des souches B31 (groupe I) et ZQ1
(groupe II) ne permet pas l'amplification de ce fragment de 188 paires de bases.

35 L'ensemble de ces résultats est repris dans le tableau 7 ci-dessous:

Tableau 7

Amorces	B31	ZQ1	Acal
BbGI1/BbGI2	+	-	-
BbGII1/BbGII2	-	+	-
BbGIII3/BbGIII2	-	-	+

Ces résultats déterminent clairement la spécificité et la validité de ces amorces. En effet, la paire d'amorces (BbGI1/BbGI2) spécifique du groupe I ne reconnaît que la souche du groupe I; de même, les paires d'amorces BbGII1/BbGII2 et BbGIII3/BbGIII2 ne reconnaissent respectivement que les souches appartenant au groupe II et au groupe III.

Exemple 4.

10 Application du crible à une variété d'isolats de souches de *Borrelia burgdorferi*. Classification - Etude par amplification génétique (PCR).

Les études d'hybridation moléculaire sur génome entier de Bb ont permis de séparer en 3 grands groupes, un grand nombre de souches connues. Cette répartition en différents groupes est également mise en évidence en comparant la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de surface OspA de différentes souches de Bb par un programme informatique adapté. Les résultats de cette analyse informatique sont corroborés par une étude phylogénétique menée sur le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. L'analyse de cette classification des souches de Bb en relation aux signes cliniques observés au cours de la maladie suggèrent un lien intéressant entre l'appartenance d'une souche à un groupe déterminé et la pathologie qui y est associée; par exemple, les souches reprises dans le groupe I montrent une propension à provoquer des signes arthritiques tandis que celles appartenant au groupe II provoquent principalement des neuroborélioses. Les souches du groupe III provoquent essentiellement des acrodermatites.

25 Différentes souches de Bb, classées ou non par les études d'hybridation moléculaire sur génome entier, ont été analysées par la méthode de PCR en utilisant les amorces spécifiques de groupes définies dans la section 2.A. - Séquences spécifiques de groupes utilisables au cours de réactions d'amplification génétique (PCR). Les résultats de cette analyse sont développés dans le tableau 8 ci-dessous où BbGI, BbGII, BbGIII et OspA
30 représentent respectivement les paires d'amorces BbGI1/BbGI2 (spécifiques des souches du groupe I), BbGII1/BbGII2 (spécifiques des amorces du groupe II), BbGIII1/BbGIII2

(spécifiques des amorces du groupe III) et OspApc1/OspApc2 (caractéristiques de toutes les souches de Bb).

Tableau 8

5

Groupe	Souches	BbGI	BbGII	BbGIII	OspA
I	IP1	++	-	-	+
	IP2	++	-	-	+
	IP3	++	-	-	+
	297 master	++	-	-	+
	IRS	++	-	-	+
	21.038	++	-	-	+
	ZS7	++	-	-	+
	B31	++	-	-	+
II	ZQ1	-	++	-	+
	Ne11H	-	+	-	+
	N34	-	+	-	+
	P/Bi	-	+	-	+
III	Acal	-	-	++	+
IV	20047	-	-	-	+
	G25	+	++	++	+
	VS461	+	-	++	+

Il résulte de cette analyse qu'un grand nombre de souches peuvent être classées dans un des groupes connus de souches de Bb. Cette classification par analyse des produits de réaction de PCR se superpose en partie à la classification établie par le groupe de Baranton et coll [6]. En effet, certaines souches (FR47, G25 et VS461) considérées par le groupe de Baranton comme étant des souches appartenant au groupe II (FR47 et G25) ou au groupe III (VS461) ne peuvent être classées dans ces groupes par simple analyse des produits de réaction de PCR. Le comportement de ces souches (FR47, G25 et VS461) vis-à-vis des amorces spécifiques de groupes conduit à la création d'un quatrième groupe de souches de Bb. Le développement de ce type d'analyse (PCR) sur un plus grand nombre d'isolats de Bb et l'étude de la séquence du gène OspA des souches du groupe IV permettront de déterminer la validité de la classification reprise dans le tableau 8

ci-dessus et conduiront éventuellement à la création de nouveaux groupes de souches de Bb.

Exemple 5.

5

Applications à des spécimens cliniques (humains et animaux).

Le spirochète Bb s'installe très rapidement dans différents organes et tissus cibles de l'hôte (vessie, système nerveux central, tissus cartilagineux) après avoir transité par le sang et le foie. Il est donc intéressant d'analyser soit par PCR soit par un système d'hybridation moléculaire directe ou de type "sandwich" les liquides biologiques infectés préférentiellement par Bb.

Après préparation rapide (lavage, centrifugation et traitement à la chaleur) de l'ADN d'une série de liquides biologiques (liquide articulaire, liquide céphalo-rachidien, serum urine) provenant de patients sains ou ayant développé une maladie de Lyme, l'ADN de ces échantillons été soumis à une amplification génétique en utilisant soit les amorces spécifiques de groupes soit les amorces communes à tous les groupes de souches de Bb. Les résultats de ces analyses sont repris dans le tableau 9 ci-dessous:

Tableau 9

Echantillon	OspA	BbGI	BbGII	BbGIII
LCR1	+	ND (1)	ND	ND
LCR2	-	ND	ND	ND
LCR-	-	-	-	ND
LAR1	+	-	+	ND
LAR2	+	-	+	ND
LAR3	-	-	-	ND
UR1	+	ND	ND	ND

20

(1) ND = non déterminé

Les résultats de ces réactions PCR permettent de confirmer le diagnostic clinique (LAR1, LAR2, UR1, LCR-) ou d'affiner celui-ci (LCR1 et LCR2: négatifs en sérologie). Ces résultats permettent de démontrer l'efficacité du traitement administré au patient (LAR3, LCR3 à 8). Ils permettent aussi d'indiquer le type de souches de Bb infectant les patients (LAR1 et LAR2: groupe II).

25

Dans la description qui précède, il est entendu que l'invention couvre également les séquences complémentaires inverses des sondes Bb50, Bb35bio, Bb23bio, BbGI23, BbGII23 et BbGIII28.

Bibliographie:

- [1] Barbour, A.G., and S.F. Hayes. 1986. Microbiol. Rev. 50, 381 - 400.
- [2] Szczepanski, A., and J.L. Benach. 1991. Microbiol. Rev. 55, 21 - 34.
- 5 [3] Lonneux, J.F., Van Impe, G., Lebrun, Ph., Tricot, J.-M., et B., Losson. 1990. Rev. Quest. Scient. 161, 189 - 208.
- [4] Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and N., Amheim. 1985. Scient. 230, 1350 - 1354.
- [5] Marconi, R.T., and C.F., Garon. 1992. J. Clin. Microbiol. 174, 241 - 244.
- 10 [6] Baranton, G., Postic, D., Saint-Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assores, M., and P.A. Grimont. 1992. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 378-383.
- [7] Assous, M.V., Postic, D., Paul, G., Nénot, P., and G., Baranton. 1992. V International Conference on Lyme Borreliosis, Abstract 06.
- [8] Hansen, K., Hindersson, P., and N.S., Pedersen. 1988. J. Clin. Microbiol. 26, 338 -
15 346.
- [9] Feng and Doolittle. 1987. J. Mol. Evol. 35, 351 - 360.
- [10] Lefebvre, R.B., Land, R.S., Pergn, G.-C., Brown, J.A., and R.C., Johnson. 1990. J. Clin. Microb. 28, 700 - 707.
- [11] Simpson, W.J., Garon, C.F., and T.G., Schwan. 1990. Infec. Imm. 58, 847 - 853.

REVENDICATIONS

1. Agent oligonucléotidique utilisable pour la mise en évidence d'au moins une souche de *Borrelia burgdorferi* (Bb), caractérisé en ce qu'il comprend au moins un
- 5 oligomère choisi parmi:

Références	Séquences
OspApc1	AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGC
OspApc2	CTAGTGTTTTGCCATCTTCT TTGAAA
Bb50	5'-ATGAAAAAATATTT ATTGGGAATAGGTCTA ATATTAGC CTTAATAGCATG-3'
Bb35bio	5'-GCAACAGTAG ACAAGCTTGA GCTTAAAGGA ACTTC-3'
Bb23bio	5'-TTTTCAAGA AGATGGCAA ACA-3'
BbGI1	5'-AACAAAGACG GCAAGTACGA TCTAATT-3'
BbGI2	5'-TTACAGTAAT TGTAAAGTT GAAGTGCC-3'
BbGII1	5'-TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC-3'
BbGII2	5'-GTAACTTTCA ATGTTGTTTT GCCG-3'
BbGIII1	5'-GAAAAAGGTG AATTGTCTGC AAAAACC-3'
BbGIII2	5'-TTCCAATGTT ACTTTATCAT TAGCTACTT-3'
BbGIII3	5'-TAAAGACAAA ACATCAACAG ATGAAATG-3'
BbGI23	5'-CTGCAGCTTG GAATTCAGGC ACT-3'
BbGII23	5'-ACTCTAGCTG CTGACGGCAA AAC-3'
BbGIII28	5'-AGGAAAAGTA GCTAATGATA AAGTAACA-3'

- 10 étant entendu que A, T, C, G représentent les nucléotides correspondant aux bases adénine, thymine, cytosine et guanine respectivement, que les séquences du tableau ci-dessus sont présentées dans l'orientation 5' → 3', que les séquences OspApc2, BbGI2,

BbGII2 et BbGIII2 sont présentées en mode complémentaire inverse à la séquence du brin codant.

2. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une
- 5 paire d'amorces d'acides nucléiques utilisables pour l'amplification génétique de l'ADN de tous les groupes de souches connues de Bb, dont l'une est située sur le brin codant et l'autre sur le brin complémentaire en aval de la première amorce, caractérisé en ce qu'il comprend la paire d'amorces suivante:

Sondes	Séquences	Long.	Tm	Position
OspApc1	AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGC	27	70°C	21 - 47
OspApc2	CTAGTGTTTT GCCATCTTCT TTGAAAA	27	70°C	328 - 302

10

- étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la position desdites amorces sur la séquence connue du gène OspA de la souche B31 de Bb, leur température de demi-hybridation et leur taille respective, que les
- 15 séquences sont présentées dans l'orientation 5' → 3' et que la séquence de l'amorce OspApc2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence du brin codant.

3. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, utilisable comme sonde commune à tous les groupes de souches de Bb, caractérisé en ce qu'il comprend un
- 20 oligomère choisi parmi les suivants et ceux de séquences complémentaires inverses:

Sondes	Séquences	Taille	Position
Bb50	ATGAAAAAATATTTATTGGAATAGGTCTAATATTA GCCTTAATAGCATG	50	1 - 50
Bb35bio	GCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTC	35	166 - 200
Bb23bio	TTTTCAAAGA AGATGGCAAA ACA	23	302 - 324

étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la taille et la position desdites séquences orientées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' sur le brin codant du gène OspA de la souche B31 de Bb, dont la séquence est connue.

4. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 3, utilisable pour la capture de l'ADN issu de tous les groupes de souches de Bb, caractérisé en ce qu'il comprend l'oligomère Bb50 tel que défini précédemment ou un oligomère de séquence complémentaire inverse.

5. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 3, utilisable comme sonde de révélation d'une réaction d'hybridation entre une sonde de capture et un ADN cible, cette sonde de révélation étant modifiée chimiquement par l'addition en 5' et/ou en 3' d'un ou plusieurs groupements permettant la révélation par coloration ou chimiluminescence, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'acides nucléiques choisie parmi les oligomères Bb35bio et Bb23bio tels que définis précédemment et les oligomères de séquences complémentaires inverses.

6. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une paire d'amorces d'acides nucléiques utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe I (notamment la souche B31), caractérisé en ce qu'il comprend la paire d'amorces suivante:

Références	Séquences	Position	Taille	T _m
BbGI1	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	139 - 165	27	74°C
BbGI2	TTACAGTAAT TGTAAAGTT GAAGTGCC	682 - 655	28	74°C

étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la position desdites amorces sur la séquence connue du gène OspA de la souche B31 de Bb en se référant au brin codant dudit gène, leur température (T_m) de demi-hybridation et leur taille respective, que les séquences sont présentées dans

l'orientation 5' → 3' et que la séquence de l'amorce BbGII2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence située sur le brin codant.

- 5 7. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une paire d'amorces d'acides nucléiques utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe II (notamment la souche B29), caractérisé en ce qu'il comprend la paire d'amorces suivante:

Références	Séquences	Position	Taille	T _m
BbGII1	TGATAAAAACAACGGTTCTGGAAC	201 - 224	24	66°C
BbGII2	GTAACCTTCAATGTTGTTTGCCG	545 - 522	24	66°C

10

- étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la position desdites amorces sur la séquence connue du gène OspA de la souche B29 de Bb en se référant au brin codant dudit gène, leur température (T_m) de demi-hybridation et leur taille respective, que les séquences sont présentées dans l'orientation 5' → 3' et que la séquence de l'amorce BbGII2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence située sur le brin codant.
- 15

- 20 8. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une paire d'amorces d'acides nucléiques utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe III (notamment la souche Acal), caractérisé en ce qu'il comprend les amorces suivantes mises en oeuvre par paires:

Références	Séquences	Position	Taille	T _m
BbGIII1	GAAAAAGGTGAATTGTCTGCAAAAACC	381 - 407	27	74°C
BbGIII2	TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT	536 - 508	29	74°C
BbGIII3	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG	347 - 374	28	72°C

étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la position desdites amorces sur la séquence connue du gène *OspA* de la souche Acal de Bb en se référant au brin codant dudit gène, leur température (T_m) de demi-hybridation et leur taille respective, que les séquences sont présentées dans l'orientation 5' → 3' et que la séquence de l'amorce BbGIII2 est présentée en mode complémentaire inverse à la séquence située sur le brin codant.

9. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une sonde d'acides nucléiques spécifique aux souches de Bb du groupe I (notamment la souche B31), soit pour la détection directe soit pour la détection indirecte via un système d'hybridation moléculaire dit "sandwich", caractérisé en ce qu'il comprend l'oligomère:

Référence	Séquence	Position	Taille	T_m
BbGI23	CTGCAGCTTGGAATTCAGGCACT	638 - 660	23	70°C

ou un oligomère de séquence complémentaire inverse, étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la température (T_m) de demi-hybridation, la taille et la position de ladite séquence, orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', sur le brin codant du gène *OspA* de la souche B31 de Bb, dont la séquence est connue.

20

10. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une sonde d'acides nucléiques spécifiques aux souches de Bb du groupe II (notamment la souche B29), soit pour la détection directe soit pour la détection indirecte via un système d'hybridation moléculaire dit "sandwich", caractérisé en ce qu'il comprend l'oligomère:

25

Référence	Séquence	Position	Taille	T_m
BbGII23	ACTCTAGCTGCTGACGGCAAAC	508 - 530	23	70°C

ou un oligomère de séquence complémentaire inverse, étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la température

(T_m) de demi-hybridation, la taille et la position de ladite séquence, orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', sur le brin codant du gène OspA de la souche B29 de Bb, dont la séquence est connue.

- 5 11. Agent oligonucléotidique suivant la revendication 1, comprenant une sonde d'acides nucléiques spécifiques aux souches de Bb du groupe III (notamment la souche Acal), soit pour la détection directe soit pour la détection indirecte via un système d'hybridation moléculaire dit "sandwich", caractérisé en ce qu'il comprend l'oligomère:

Référence	Séquence	Position	Taille	T _m
BbGIII28	AGGAAAAGTAGCTAATGATAAAGTAACA	503 - 530	28	70°C

10

- ou un oligomère de séquence complémentaire inverse, étant entendu que A, T, C et G ont les significations données précédemment, que le tableau ci-dessus présente la température (T_m) de demi-hybridation, la taille et la position de ladite séquence, orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', sur le brin codant du gène OspA de la souche Acal de Bb, dont la séquence est connue.

15

12. Agent oligonucléotidique suivant l'une quelconque des revendications 9 à 11, lorsqu'il est utilisé pour la détection indirecte via un système d'hybridation moléculaire dit "sandwich" en tant que sonde de capture spécifique au groupe de souches du Bb considéré (respectivement I, II et III) en combinaison avec une sonde de révélation, laquelle comporte un oligomère Bb35bio ou Bb23bio ou son complémentaire inverse tel que défini à la revendication 3, modifié chimiquement par l'addition en 5' et/ou en 3' d'un ou plusieurs groupements permettant la révélation par coloration ou chimiluminescence.

20

13. Agent oligonucléotidique suivant l'une quelconque des revendications 9 à 11, lorsqu'il est utilisé, en combinaison avec une sonde de capture commune à tous les groupes des souches de Bb, pour la détection indirecte via un système d'hybridation moléculaire dit "sandwich" en tant que sonde de révélation spécifique au groupe de souches du Bb considéré (respectivement I, II et III), cette sonde de révélation étant modifiée chimiquement par l'addition en 5' et/ou en 3' d'un ou plusieurs groupements permettant la révélation par coloration ou chimiluminescence.

25

30

14. Procédé de détection de *Borrelia burgdorferi* (Bb) consistant à réaliser un hybride moléculaire entre une sonde de capture et l'ADN du Bb préalablement dénaturé et à mettre en oeuvre une sonde de révélation destinée à révéler la présence de l'hybride moléculaire précité, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre une sonde de capture
5 telle que définie à la revendication 4 et une sonde de révélation telle que définie à la revendication 5.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que la sonde de capture mise en oeuvre est spécifique aux souches de Bb du groupe I (notamment la
10 souche B31) et est telle que définie à la revendication 9.

16. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que la sonde de capture mise en oeuvre est spécifique aux souches de Bb du groupe II (notamment la souche B29) et est telle que définie à la revendication 10.

15

17. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que la sonde de capture mise en oeuvre est spécifique aux souches de Bb du groupe III (notamment la souche Acal) est telle que définie à la revendication 11.

20

18. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé par la mise en oeuvre d'une sonde de capture commune à tous les groupes de souches de Bb, caractérisé en ce que la sonde de révélation est spécifique aux souches de Bb du groupe I (notamment la souche B31) et est telle que définie à la revendication 9.

25

19. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé par la mise en oeuvre d'une sonde de capture commune à tous les groupes de souches de Bb, caractérisé en ce que la sonde de révélation est spécifique aux souches de Bb du groupe II (notamment la souche B29) et est telle que définie à la revendication 10.

30

20. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé par la mise en oeuvre d'une sonde de capture commune à tous les groupes de souches de Bb, caractérisé en ce que la sonde de révélation est spécifique aux souches de Bb du groupe III (notamment la souche Acal) et est telle que définie à la revendication 11.

21. Procédé de détection de *Borrelia burgdorferi* (Bb) par amplification génétique des fragments d'ADN dénaturé caractéristiques de ce micro-organisme, comprenant l'hybridation d'une paire d'amorces à l'ADN cible, la synthèse d'un ADN complémentaire à l'ADN cible et la dissociation des hybrides formés au cours des deux premières étapes, caractérisé par la mise en oeuvre d'une paire d'amorces utilisables pour l'amplification génétique de l'ADN de tous les groupes de souches connues de Bb, cette paire d'amorces étant définie à la revendication 2.

22. Procédé suivant la revendication 21, caractérisé par la mise en oeuvre d'une paire d'amorces utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe I (notamment la souche B31), cette paire d'amorces étant définie à la revendication 6.

23. Procédé suivant la revendication 21, caractérisé par la mise en oeuvre d'une paire d'amorces utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe II (notamment la souche B29), cette paire d'amorces étant définie à la revendication 7.

24. Procédé suivant la revendication 21, caractérisé par la mise en oeuvre d'une paire d'amorces utilisables pour l'amplification génétique des souches de Bb du groupe III (notamment la souche Acal), cette paire d'amorces étant choisie parmi celles définies à la revendication 8.

25. Application d'un agent oligonucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou d'un procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 14 à 24 pour le diagnostic de *Borrelia burgdorferi* (Bb) dans les liquides biologiques d'origine humaine ou animale.

26. Application suivant la revendication 25, plus particulièrement à l'épidémiologie et l'étude des animaux réservoirs.

27. Application suivant la revendication 25, plus particulièrement comme aide à la thérapeutique des infections par Bb, pour le suivi de l'efficacité des vaccinations ainsi que de la composition des vaccins.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE 94/00012A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12Q1/68

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 C12Q

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.
X	WO,A,90 04411 (SYMBICOM AKTIEBOLAG) 3 May 1990 see page 22, line 27 - page 24, line 20; claims 67-72; figure 5 ---	1-27
X	WO,A,92 09703 (CBR LABORATORIES) 11 June 1992 see the whole document ---	1,9, 12-15, 18,25-27
A	WO,A,93 00448 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 7 January 1993 see the whole document --- -/--	1-27

☒ 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

16 May 1994

Date of mailing of the international search report

12.07.94

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE 94/00012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 31, no. 2 , February 1993 , WASHINGTON US pages 340 - 350 WILSKE ET AL. ---	
A	GENE. vol. 120 , 1992 , AMSTERDAM NL pages 127 - 128 FELLINGER ET AL. ---	
P,X	WO,A,93 04175 (SMITHKLINE BEECHAM) 4 March 1993 see example 2 ---	1,2,9, 15,18,21
P,X	WO,A,93 08306 (SYMBICOM AKTIEBOLAG) 29 April 1993 see claims; table 1 -----	1,3,5,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/BE 94/00012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9004411	03-05-90	AU-B- 639667	05-08-93
		AU-A- 4495389	14-05-90
		CA-A- 2001328	24-04-91
		EP-A- 0445135	11-09-91
		EP-A- 0565208	13-10-93
-----	-----	-----	-----
WO-A-9209703	11-06-92	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO-A-9300448	07-01-93	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO-A-9304175	04-03-93	AU-A- 2432792	16-03-93
-----	-----	-----	-----
WO-A-9308306	29-04-93	AU-A- 2903892	21-05-93
		EP-A- 0540457	05-05-93
-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.
PCT/BE 94/00012

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12Q1/68

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 C12Q

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
X	WO,A,90 04411 (SYMBICOM AKTIEBOLAG) 3 Mai 1990 voir page 22, ligne 27 - page 24, ligne 20; revendications 67-72; figure 5 ---	1-27
X	WO,A,92 09703 (CBR LABORATORIES) 11 Juin 1992 voir le document en entier ---	1,9, 12-15, 18,25-27
A	WO,A,93 00448 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 7 Janvier 1993 voir le document en entier --- -/--	1-27

☒ 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

16 Mai 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12.07.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Molina Galan, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 31, no. 2 , Février 1993 , WASHINGTON US pages 340 - 350 WILSKE ET AL. ---	
A	GENE. vol. 120 , 1992 , AMSTERDAM NL pages 127 - 128 FELLINGER ET AL. ---	
P,X	WO,A,93 04175 (SMITHKLINE BEECHAM) 4 Mars 1993 voir exemple 2 ---	1,2,9, 15,18,21
P,X	WO,A,93 08306 (SYMBICOM AKTIEBOLAG) 29 Avril 1993 voir revendications; tableau 1 -----	1,3,5,14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No.

PCT/BE 94/00012

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9004411	03-05-90	AU-B- 639667	05-08-93
		AU-A- 4495389	14-05-90
		CA-A- 2001328	24-04-91
		EP-A- 0445135	11-09-91
		EP-A- 0565208	13-10-93
WO-A-9209703	11-06-92	AUCUN	
WO-A-9300448	07-01-93	AUCUN	
WO-A-9304175	04-03-93	AU-A- 2432792	16-03-93
WO-A-9308306	29-04-93	AU-A- 2903892	21-05-93
		EP-A- 0540457	05-05-93