

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-535807  
(P2004-535807A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G 0 4 3
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	G O 1 N 21/64	2 G 0 5 4
G O 1 N 21/64	G O 1 N 21/64	4 B 0 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-510458 (P2003-510458)  
 (86) (22) 出願日 平成14年7月3日(2002.7.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月5日(2004.1.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/002317  
 (87) 国際公開番号 WO2003/004700  
 (87) 国際公開日 平成15年1月16日(2003.1.16)  
 (31) 優先権主張番号 01/08803  
 (32) 優先日 平成13年7月3日(2001.7.3)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

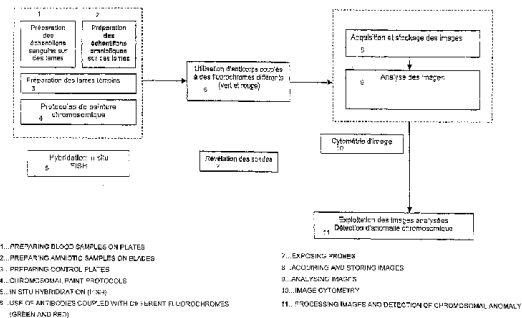
(71) 出願人 504006478  
 イムスター イメージ エト モデリゼイ  
 ション: ストラテジー アナライズ リア  
 リゼイション  
 フランス国 パリ リュ ノートル ダム  
 デス シャンプス 60  
 (71) 出願人 504007888  
 センター ナショナル デ ラ レシエル  
 シュ サイエントフィーク  
 フランス国 パリ リュ ミシエル アン  
 ジェ 3  
 (71) 出願人 504006467  
 インスティテュート キュリエ  
 フランス国 パリ リュ ディウルム 2  
 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 間期核の蛍光インサイチューハイブリダイゼーションによって染色体間不均衡を検出する方法およびシステム

(57) 【要約】

本発明は、以下の相を含む、間期核上での蛍光プローブのインサイチューハイブリダイゼーションによって染色体不均衡を検出するシステムに関する；異なる二つの染色体上で蛍光プローブをインサイチューでハイブリダイズさせる段階；それぞれのプローブを異なる蛍光色素に曝露する段階；測定が、対照細胞集団において、および検出を行う細胞集団において行われる、このように曝露されたそれぞれのプローブにそれぞれ対応するシグナル強度を核の集合体上で測定する段階；比の計算が、参照比を提供するための前記対照細胞集団および検出を行う前記集団について行われる、プローブのそれぞれに対応するシグナル間の比を計算する段階；検出を行う集団に対応する蛍光比を参照比と比較する段階；および比較の結果を処理して、染色体間不均衡を検出する段階。



**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

以下の相を含む、間期核に対する蛍光インサイチューハイブリダイゼーションによって染色体間不均衡を検出する方法：

- 異なる二つの染色体上で蛍光プローブをインサイチューでハイブリダイズさせる段階、
- 異なる蛍光色素によってそれぞれのプローブを可視化する段階、
- 測定が最初に対照細胞集団において行われ、次に、検出すべき細胞集団において行われる、一組の核においてこのように可視化されたそれぞれのプローブにそれぞれ対応するシグナル強度を測定する段階、
- 比の計算が最初に、参照比を提供するために対照細胞集団について行われ、次に検出すべき細胞集団について行われる、プローブにそれぞれ対応するシグナル間の比を計算する段階、
- 検出すべき細胞集団に対応するシグナル間の比を参照比と比較する段階、および
- 染色体間不均衡を検出するためにこの比較結果を処理する段階。

10

**【請求項2】**

各プローブにそれぞれ対応する二つのシグナルの測定が自動画像サイトメトリーによって行われることを特徴とする、請求項1記載の方法。

**【請求項3】**

二つのプローブがそれぞれ、異なる二つの蛍光色素によって可視化される（例えば緑色蛍光色素と赤色蛍光色素）ことを特徴とする、請求項1および2のいずれかに記載の方法。

20

**【請求項4】**

それぞれのプローブからの強度シグナルが、オペレーターによって定義されうる核の数、例えば数百個について測定されることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項5】**

測定相が、所定の画像倍率で、分析可能な核の少なくとも既定数を得るために、定義された測定面において、所定の数の視野を獲得することからなる第一の段階を含むことを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項6】**

獲得段階が同様に、それぞれの視野に関して、複数の蛍光色素（例えば、対比染色のために青色、プローブを標識するために緑色と赤色）の波長に対応する複数の平面にそれぞれ対応するいくつかの画像を、連続的な光学フィルタリングによって獲得すること、獲得した画像を保存すること、および獲得した画像と保存した画像とを重ね合わせることを含むことを特徴とする、請求項5記載の方法。

30

**【請求項7】**

獲得段階が、対照細胞集団および検出すべき細胞集団と実質的に同一である獲得条件で行われることを特徴とする、請求項5および6のいずれかに記載の方法。

**【請求項8】**

対照細胞集団および検出すべき細胞集団にそれぞれ対応する獲得が、同じ測定面に含まれる二つの視野において行われることを特徴とする、請求項7記載の方法。

40

**【請求項9】**

測定相がまた、核を検出して蛍光強度シグナルを定量する第二の段階も含むことを特徴とする、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項10】**

検出および定量段階が、測定面に含まれるそれぞれの視野において核のセグメント化を含むことを特徴とする、請求項9記載の方法。

**【請求項11】**

核のセグメント化に、凝集物からの核の分離が含まれることを特徴とする、請求項10記載の方法。

50

## 【請求項 1 2】

核のセグメント化に、形態および大きさの基準による人工産物の消失が含まれることを特徴とする、請求項10および11のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3】

検出および定量段階が、各プローブに対応する各色に関してそれぞれの核内で積分された蛍光シグナル強度の定量を含むことを特徴とする、請求項9～12のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

検出および定量段階がまた、各視野において、核外のそれぞれの色に関するバックグラウンドレベルの計算も含むことを特徴とする、請求項13記載の方法。

10

## 【請求項 1 5】

検出および定量段階が同様に、ノイズ参照レベルとして最も一般的なバックグラウンドレベルの決定およびそれぞれの核内で定量された蛍光シグナル強度の参照レベルによる補正も含むことを特徴とする、請求項14記載の方法。

## 【請求項 1 6】

以下を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法を用いて、間期核において蛍光インサイチュールハイブリダイゼーションによって染色体不均衡を検出するシステム：

- 異なる二つの染色体上で蛍光インサイチュールハイブリダイゼーションを行う手段、
- 異なる蛍光色素によってそれぞれのプローブを可視化する手段、
- 最初に対照細胞集団における、次に、検出すべき細胞集団における一組の核について、このように可視化されたそれぞれのプローブにそれぞれ対応する強度シグナルを測定する手段、
- 最初に、参照比を提供するために対照細胞集団に関して、次に検出すべき細胞集団に関して、プローブにそれぞれ対応するシグナル間の比を計算する手段、
- 検出すべき細胞集団に対応するシグナル間の比を参照比と比較する手段、および
- モザイクの場合においても、染色体間不均衡を検出する目的で、この比較の結果を処理する手段。

20

## 【請求項 1 7】

測定手段として画像サイトメトリー装置を含むことを特徴とする、請求項16記載の検出システム。

30

## 【請求項 1 8】

画像サイトメトリー装置が以下を含むことを特徴とする、請求項17記載の検出システム：

- 予め蛍光インサイチュールハイブリダイゼーションを行う細胞集団に適用される多数の蛍光顕微鏡手段、
- 蛍光顕微鏡手段によって得られた画像を獲得する手段、
- 獲得画像を保存する手段、および
- 該獲得画像および保存画像を分析する手段。

## 【請求項 1 9】

所定の画像倍率で、少なくとも既定数の分析可能な核を得るために、定義された測定面において所定の数の視野を獲得するために、蛍光顕微鏡手段と画像獲得手段とが協調して作用することを特徴とする、請求項18記載の検出システム。

40

## 【請求項 2 0】

それぞれの視野に関して、複数の蛍光色素（例えば：対比染色のためにDAPI（青色）、プローブのためにFITC（緑色）およびテキサスレッド（商標）（赤色））の波長に対応する複数の平面にそれぞれ対応するいくつかの画像を獲得するために、蛍光顕微鏡手段と獲得手段とを協調作用させるフィルタリング手段を含むことを特徴とする、請求項19記載の検出システム。

## 【請求項 2 1】

同じ分析平面内で対照細胞集団に対応する画像と検出すべき細胞集団に対応する画像とを獲得するために、蛍光顕微鏡手段と獲得手段とが協調作用することを特徴とする、請求項

50

18～20のいずれか一項に記載の検出システム。

【請求項22】

画像サイトメトリ装置がまた、核を検出して、多数の波長の蛍光シグナルを定量する手段も含むことを特徴とする、請求項17～21のいずれか一項に記載の検出システム。

【請求項23】

形態測定および密度測定分析に基づいて核をセグメント化して、測定面の全ての視野に関するマスクを作製するように、検出および定量手段が組織化されることを特徴とする、請求項22記載の検出システム。

【請求項24】

検出および定量手段が、凝集物から核を分離するように組織化されることを特徴とする、請求項22または23記載の検出システム。 10

【請求項25】

検出および定量手段が、大きさおよび形態の基準による人工産物を排除するように組織化されることを特徴とする、請求項22～24のいずれか一項に記載の検出システム。

【請求項26】

検出および定量手段が、それぞれの色に関してそれぞれの核内で積分された蛍光シグナル強度を定量するように組織化されることを特徴とする、請求項22～25のいずれか一項に記載の検出システム。

【請求項27】

検出および定量手段が、核外のそれぞれの色に関してバックグラウンドレベルを計算するように組織化されることを特徴とする、請求項22～26のいずれか一項に記載の検出システム。 20

【請求項28】

検出および定量手段が、バックグラウンド参照値として最も一般的なバックグラウンドレベルを決定して、それぞれの核内で定量された強度から前記参照値を差し引くように組織化されることを特徴とする、請求項22～27のいずれか一項に記載の検出システム。

【請求項29】

請求項1～15のいずれか一項に記載の染色体間検出方法の、母親の血液中で循環する胎児細胞の核への適用。

【発明の詳細な説明】 30

【技術分野】

【0001】

本発明は、間期核の蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション(FISH)によって染色体間不均衡を検出する方法に関する。本発明はまた、この方法を用いるシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

新生児において認められる最も再発性の構成的染色体不均衡は、第21染色体、第18染色体および第13染色体ならびに性染色体に関する。トリソミー21(ダウン症候群)は最も再発性の異常であり、子供1000人あたり約1.7人が罹患する(Stollら、1998)。

【0003】 40

トリソミー21の症例数は、母親の年齢と共に、特に35歳以降増加し、高齢妊娠の場合には出生前検査が勧告される。現在、妊娠年齢の高齢化傾向がある。35歳を超えて出産する女性の割合は4年間で8%から19%に増加した(Stollら、1994)。この割合はさらに増加すると推定されうるが、現在のところフランスにおける出生数は年間750,000例であるため、トリソミー21試験の必要性はおそらく、年間150,000回の回数である。

【0004】

1970年代以降、通常の細胞遺伝学を用いて羊水穿刺による出生前診断が一般的に行われており、それによって中期染色体上で核型を確立して、このように異常な染色体数を検出することが可能となっている。試料の採取から診断結果までの期間が比較的長いこと(2週間)が、この技術の一番の欠点である。さらに、使用可能な中期細胞を得ることは、症例 50

の100%において確実ではなく（失敗率1%）、母親の細胞が存在することによって偽陽性が現れうる（Vermaら、1998）。

【0005】

より最近、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション（FISH）によって、細胞培養に訴える必要なく、間期細胞に対して直接作業を行うことができるようになった。この技術は、蛍光プローブを用いて染色体（例えば、米国特許第5,756,696号を参照されたい）または染色体領域を標識すること、およびシグナル、すなわち蛍光シグナルを放出する染色体を計数することからなる（Pierluigiら、1996；Steinbornら、1996；Weiら、1997；Eibenら、1999）。このように、全く短期間（数日）で結果を得ることが可能であり、分析は採取した少数の細胞（数百個）について行うことができるが、細胞培養はより多数の細胞（数万個およびそれ以上）を必要とする。

10

【0006】

様々なタイプのプローブがこれらの研究に用いられている：セントロメア領域または第21染色体長腕領域を範囲に持つプローブ（コスミド、YACs）（Solovievら、1995、Van Opst adら、1995；Pierluigiら、1996；Steinbornら、1996）。これらのプローブによる第21染色体の部分的標識によって、コピー数を評価することができる。したがって、第21染色体に対応する三つのシグナルを有する細胞を検出するために、手動または自動シグナル計数を行う必要がある。

【0007】

いくつかの研究から、胎児細胞のインサイチューハイブリダイゼーションが技術的に実現可能であることが示されている。しかし、FISH法と通常の細胞遺伝学による診断とのあいだを直接比較した結果を得る研究はほとんどない（Pierluigiら、1996；Steinbornら、1996；Weiら、1997；Eibenら、1999；Theinら、2000）。それらの研究の著者らは、二つのアプローチによって97～100%一致すると述べているが、同様に、間期FISHによる結果を解釈する難しさも強調している。これらの問題は、蛍光シグナルを認識して計数するヒトオペレーターが必要であることに本質的に連結している。現在、オペレーターが異なれば、特に異常な数のシグナルを有する核の数の統計学的重要性とのあいだに明らかなばらつきがあることは、診断に関して問題を提起する。観察者間のばらつきは、「スポット」（すなわち、蛍光シグナルのスポット）を定義する場合の様々な基準、例えば、その大きさ、その強度、およびその構造に由来するが、スポットは核における垂直軸Zに従って、しばしば様々な巢状平面に存在するという事実のためでもある。

20

30

【0008】

したがって結果は、それ自体それぞれの研究所において試料の調製によって左右されるこれらの基準に従って有意に異なりうる。「カットオフ」、すなわちこの値以降、試料が異常であると見なされる「陽性閾値」を確立することによって、かなりの偏りが起こる（Ruangvutilertら、2000）。対照例においてシグナル3個を有する核の割合の範囲が、分析した核の10～20%の範囲となりうるため、この値は確立することが難しい。分析すべき細胞数そのものが50～200個となりうることから、この値は試験によって変化し、これがこの統計学的ばらつきの原因である。さらに、この試験の医学的解釈を行うためには、染色体数の異常を有する核（モザイク）の比率の値を信頼できるように知ることが重要であるかも知れない。

40

【発明の開示】

【0009】

本発明の目的は、まさにそのデザインによって、ヒトオペレーターによる読みに関連する問題をなくし、これまでその分析に影響を及ぼしていた試料の調製におけるばらつきに関する問題の解決を提供する自動検出法を提供することである。

【0010】

この目的は、以下の相を含む、間期核上での蛍光インサイチューハイブリダイゼーション（FISH）によって、コンピューター化システムを用いて染色体間不均衡を検出する方法によって得られる：

50

- 異なる二つの染色体上で蛍光プローブをインサイチューでハイブリダイズさせる段階、
- 異なる蛍光色素によってそれぞれのプローブを可視化する段階、
- 測定が最初に対照細胞集団において行われ、次に、検出すべき細胞集団において行われる、一組の核の上でこのように可視化されたそれぞれのプローブにそれぞれ対応する強度シグナルを測定する段階、
- 比の計算が最初に、参照比を提供するために対照細胞集団について行われ、次に検出すべき細胞集団について行われる、前記プローブにそれぞれ対応する前記シグナル間の比を計算する段階、
- 検出すべき細胞集団に対応するシグナル間の比を参照比と比較する段階、および
- 染色体間不均衡を検出するためにこの比較結果を処理する段階。

10

## 【0011】

本発明の目的に関して、「インサイチューハイブリダイゼーション」という用語は、調べるものと相同な特異的配列のプローブによって、DNA（またはRNA）配列を配置するための技術を指すと意図される。これは、ヌクレオチド相補性（A/T、A/U、G/C）に基づく；これは、染色体、細胞、または組織調製物上で正確な物理化学的条件において行うことができる。インサイチューハイブリダイゼーションプロセスの結果は、プローブと標的のあいだのハイブリッドの形成である。インサイチューハイブリダイゼーションには、変性段階、標的上でプローブをインサイチューでハイブリダイズさせる実際の段階、およびハイブリッドまたはプローブを検出する段階が含まれる。蛍光インサイチューハイブリダイゼーションの場合、プローブは蛍光体によって標識し、ハイブリダイゼーションは、蛍光標識によって可視化する。この技術の最近の発達によって、それぞれが異なる蛍光体によって可視化されるいくつかのプローブを同じ調製物において同時に可視化することができる。

20

## 【0012】

各プローブにそれぞれ対応する二つまたはそれ以上のシグナルの測定は、画像サイトメトリーによって都合よく行われる。例えば、二つのプローブを緑色蛍光色素と赤色蛍光色素によってそれぞれ可視化することができる。

## 【0013】

このように、間期核でのFISHによる分析の長所を、シグナルの読みの長所と組み合わせた画像サイトメトリーによるアプローチが開発され、これは、オペレーターとは無関係であることから、迅速、正確、定量的、および客観的である。

30

## 【0014】

このアプローチは、最初に、不均衡を示す染色体に関して染色体の染色または染色体領域の染色を用いること、次に、もう一つの染色体（常染色体または性染色体）の染色を用いることからなり、後者は、染色体の染色によって得られたハイブリダイゼーションシグナルが不均衡を示す染色体の染色によって得られたシグナルと比較できるように選択される。実際に、参考染色体と不均衡を示す染色体とは、可能な限り大きさが類似である。このように、例えば、第21染色体の染色によって得られたハイブリダイゼーションシグナルは、大きさが類似である第20染色体または第22染色体の染色によって得られたシグナルと同等であることから、本発明のアプローチは、最初に第21染色体に関する染色を行い、例えば次に参照として用いる第20染色体または第22染色体、第20染色体または第22染色体に関する染色または染色体領域の染色を用いることからなる。第13染色体の異数性（例えば、トリソミー13）に関しては、参照染色体は、好ましくは第14および15染色体から選択される。第18染色体の異数性（例えば、トリソミー18）に関しては、参照染色体は、好ましくは第17、19、および20染色体から選択される。X染色体の異数性に関しては、参照染色体は、例えば第6、7、8、9、10、11および12染色体から選択される。Y染色体の異数性の場合、参照染色体は、好ましくは第19、20、21、および22染色体から選択される。

40

## 【0015】

好ましい態様に従って、インサイチューハイブリダイゼーションにおいて用いられるプローブは、染色体染色プローブである。「染色体染色プローブ」または「染色体染色」とい

50

う用語は、ハイブリダイゼーション条件において多染色体ゲノムの既定の染色体を含む標的とハイブリダイズするために適しているプローブまたはプローブ組成物を指すと意図される。そのようなプローブ組成物とのそのようなハイブリダイゼーションを行う試料中に、そのような染色体のごく一部が存在すれば、この画分はハイブリダイズして同定される。実際に、2個または3個等の既定の染色体の同時標識および検出を行うために、染色されたプローブを第二、第三等の染色体と混合することができる。様々な染色プローブが現在市販されている（ギブコ-BRL (GIBCO-BRL) ; オンコー (ONCOR) ; ベーリンガー・マンハイム (BOEHRINGER-MANHEIM) 等）。それらは、IRS-PCR増幅（例えば、国際公開公報第00/22164号を参照されたい）によって、染色体の縮重PCRプライマーを用いるDOT-PCR増幅によって、または染色体ソーティング、フローサイトメトリー、もしくは染色体の顕微解剖によって単離された染色体断片から調製される。または、本発明において用いられるプローブは、セントロメア領域（-サテライトDNA）または染色体腕（テロメア配列、例えば、TTAGG<sub>n</sub>）の全てもしくは一部を範囲に含むプローブ、または一つもしくはそれ以上の染色体（通常のサテライトDNA 1、2、および3）に対して特異的な反復DNA配列に特異的なプローブである。

10

**【0016】**

好ましい態様に従って、染色体染色プローブは、発光物質、色素等のような非同位元素部分によって標識される。この標識は、プローブを酵素、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン等によって標識することによって間接的に行うことができ、これらを発光物質または色素によって可視化する。発光物質は、励起エネルギー源に応じて、放射発光、化学発光、生物発光および光発光（蛍光および燐光を含む）として分類することができる。「蛍光」という用語は、一般的に例えば紫外光のようなエネルギー源によって励起された場合に光を発する物質（蛍光体のような）の特性を意味する。より好ましくは、プローブは蛍光体によって標識する。

20

**【0017】**

本発明において、本発明者らは、任意の動物またはヒト間期細胞、特に羊水または母親の血液に由来する胎児細胞における染色体間不均衡を検出することを提案する。構成的または後天性（癌）の染色体不均衡の検出はまた、例えば、末梢血細胞、皮膚細胞、口腔内細胞、およびより一般的に診断試験を行うために容易に入手可能な任意の細胞タイプにおいて行うことができる。

30

**【0018】**

本発明において、本発明者らは、分析される染色体のコピー数を検出する代わりに、以下のように染色体間不均衡を検出することを提案する：

- 第21染色体および第22染色体（例えば）に関するプローブのインサイチューハイブリダイゼーションの後に、それぞれのプローブが異なる蛍光色素（緑色または赤色）によって可視化される、
- それぞれのプローブの強度が、システムによって認識させた後に、対照細胞集団においておよび試験集団において少なくとも数百個（例えば、500個）の核について測定される、コンピューター化画像サイトメトリーシステムを用いて、
- それぞれのプローブからの二つの強度シグナル間の比の計算により、正常な参考例と比較することによって、少なくとも一つの過剰染色体（例えば、第21染色体）の存在を決定することができる。そうであれば染色体内不均衡は1より大きく、トリソミーの場合には1.5である。プローブのそれぞれからの二つの強度シグナル間の比の計算によっても、正常な参照例と比較することによって染色体モノソミーの有無を決定することができる。その場合、染色体間不均衡は0.5となると考えられる。

40

**【0019】**

現行の検出法と比較した本発明に従う検出法の長所は、以下の通りである：

- FISH法を用いる事実により、本発明に従う検出法は、細胞培養に関連した全ての短所を回避することができ、少数の細胞（細胞500個～数千個）を有する試料に関して統計学的に有意であって制限的でない多くの細胞について、結果をより迅速（数日間で）に得

50

ることができる。

- 分析はコンピューター化システムによって自動的に行われることから、ヒトオペレーターによる読み取りおよび解釈に関連した問題、特に間期核の認識に関する問題はこの方法によって全て消失し、各プローブとのハイブリダイゼーションに関連した総蛍光強度の測定によって、現在提唱されている蛍光シグナルの認識および計数 (Tkachukら、1991における「スポット計数」) を用いる場合より、分析はかなり単純となり、はるかにより強くなる。

#### 【0020】

その上、小さいプローブを用いるほうが、計数にとってよりよい解像度を有するシグナルを生じる場合でも、前記シグナルは、バックグラウンドノイズによって容易に混同され、したがってシグナル対ノイズ比は低くなり、まして羊水は、かなりのバックグラウンドノイズ源である多数のタンパク質を含むことから、シグナル対ノイズ比はなお低くなる。染色体染色を用いる本発明者らのアプローチは、得られたシグナルの大きさのために、小さいシグナルの計数 (特にセントロメアプローブの計数) を用いる方法より高いシグナル対ノイズ比を提供する。

10

#### 【0021】

バックグラウンドノイズを評価して差し引くことによって、羊水試料の特徴のために難しい条件においてもトリソミー細胞を検出することができる。

#### 【0022】

さらに、試料調製のばらつきに関する問題は、分析に影響を及ぼさない。二つのシグナルが同じように影響を受けるために、実験条件において起こりうる変化は、蛍光比を変化させないと考えられる。より多数の核を迅速に分析できるという事実により、より良好な統計学的精度でより良好な信頼性によって細胞集団内の二つの集団の存在を検出することが可能である。これによって、母親の細胞の混入例またはモザイク例 (胎児の細胞画分のみが異常を示す症例) を区別することが可能となる。

20

#### 【0023】

- 最後に、第21同位染色体またはt転座 (21; 21) を含む特定の症例 (Stollら、1998) は、再構成染色体の特性によらず、より良好な信頼性で検出される。染色体の染色を用いると、大きさおよび強度が倍加するスポットを示す。取り付けたカメラによる測定はシグナルの大きさを考慮すればなおもより正確である。このアプローチは第13染色体および第18染色体ならびに性染色体に関する他の病態にも適用することができるが、染色体数の不均衡が存在する他の病態 (モノソミー、トリソミー、クアドリソミー等、ポリソミー) にも適用することができる。注意しなければならないのは、蛍光インサイチューハイブリダイゼーションFISH法は、仏国特許出願第2783253号で公表されている特許出願において開示されている異なる方法において、間期核の染色体内不均衡を検出するために、より正確には、染色体腕の全てまたは一部の遺伝子材料の喪失または獲得 (欠失、挿入、増幅、複製等) を検出するために既に用いられていることである。本発明の検出法において、異なる二つの蛍光色素によって標識され、染色体の長腕および単腕に対してそれぞれ特異的である二つのプローブをこの同じ染色体上でハイブリダイズさせる。

30

#### 【0024】

本発明に従う方法の特に都合のよい態様において、測定する段階は、所定の画像倍率に関して、分析可能な核の少なくとも既定数 (数百または数千) を得るために、定義された測定面において、所定の数の視野を獲得することからなる第一の段階を含む。

40

#### 【0025】

獲得段階はまた、連続的な狭い帯域光学フィルタリングによって、それぞれの観察視野に関して、複数の蛍光色素 (例えば: 青色の蛍光を有する4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)、緑色の蛍光を有するフルオレセインイソチオシアネート (FITC)、および赤色の蛍光を有するテキサスレッド (Texas Red) (商標)) の波長に対応する複数の平面にそれぞれ対応するいくつかの画像を捕獲すること、これらの獲得した画像を保存して、獲得した画像と保存された画像とを重ねることを含む。

50

## 【0026】

本発明のもう一つの局面に従って、以下を含む、本発明に従う方法を用いて、間期核の蛍光インサイチューハイブリダイゼーションによって、染色体領域の不均衡を検出するシステムを提案する：

- 異なる二つの染色体上で蛍光インサイチューハイブリダイゼーションを行う手段、
- 異なる蛍光色素によってそれぞれのプローブを可視化する手段、
- 最初に対照細胞集団における、および次に検出すべき細胞集団における一組の核において、このように可視化されたそれぞれのプローブに対してそれぞれ対応する強度シグナルを測定する装置、
- 参照比を提供するために最初に対照細胞集団について、および次に検出すべき細胞集団について、前記プローブにそれぞれ対応するシグナル間の比を計算する手段、
- 検出すべき細胞集団に対応するシグナル比を参照比と比較する手段、および
- 染色体間不均衡を検出する目的でこの比較結果を処理する手段。

## 【0027】

画像サイトメトリー装置は以下を含むことが都合がよい：

- 蛍光インサイチューハイブリダイゼーションを行う細胞集団に予め適用される多数の蛍光顕微鏡手段、
- 蛍光顕微鏡手段によって生成された画像の組を獲得する手段、
- 獲得された画像を保存する手段、および
- 獲得された画像と保存された画像とを分析する手段。

## 【0028】

蛍光顕微鏡手段および画像獲得手段は、所定の画像倍率に関して少なくとも既定数の分析可能な核を得るために、定義された測定面において、所定の数の視野を獲得するように協調作用する。

## 【0029】

本発明に従う検出システムの好ましい構造において、システムはまた、それぞれの視野に関して複数の蛍光色素（例えば、DAPI、FITC（緑色）、テキサスレッド（赤））の波長に対応する複数の平面にそれぞれ対応するいくつかの画像を獲得するために、蛍光顕微鏡手段および獲得手段と協調して作用するフィルタリング手段を含む。

## 【0030】

その上、蛍光顕微鏡手段および獲得手段は、同じ分析平面において、対照細胞集団に対応する画像と検出すべき細胞集団に対応する画像とを獲得するために協調して有利に作用しうる。

## 【0031】

本発明の他の長所および特徴は、決して制限的でない態様および以下の添付の図面に関する詳細な説明を調べれば明らかとなると思われる。

## 【0032】

検出および定量相の前に行われる最初の調製およびハイブリダイゼーション相を、特に図1を参考にして、本発明に従う検出法の実行例という意味において、まず説明する。

## 【0033】

#### 試料の調製

現在羊水に由来する試験試料は、これが培養物中の試料を含むかまたは直接分析されるスライドガラス上での通常の細胞遺伝学分析のために調製される。しかし、スライドガラスの自動分析を改善するために、スライドガラスへのスポットプレーティングに関しては、細胞を平坦にプレーティングするためにウェルの遠心分離を用いる（例えばサイトスピン（cytospin）（商標））ことが推奨される。これによって、自動読み取りのあいだに「焦点がぼやける」細胞数を減少させることができる。プレーティング部位を限定することによっても、画像の獲得時間が短縮される。

## 【0034】

培養した羊水試料を、通常の出生前診断プロトコールに従って処理する。直接の液体分析

の場合、ペプシンによる処置の後に、細胞凝集物解離培地による処置を行う。

【0035】

プレーティングはまた、ウェルの遠心を用いて行う。対照スライドガラスは、同じプロトコールに従って正常な羊水または正常線維芽細胞から調製することができる。さらに、分析はまた、血液試料について行うことができる。母親の末梢血に由来する試料の場合、予め胎児細胞の検出を行う。

【0036】

プローブの調製

インサイチュハイブリダイゼーションは、染色体を染色するための通常のプロトコール (Truongら、1998) に従って行うことができる。まず、スライドガラスを2SSC生理食塩液溶液において15分間インキュベートした後、PBS緩衝液によってすすぎ、0.01 N HCl中でペプシン処理 (4  $\mu$ g/ml、シグマ (Sigma)) を10分間行う。消化を5分間のPBS浴によって停止させ、スライドガラスをカルノア固定液 (エタノール/酢酸、3:1 (v/v)) において10分間固定して、空気乾燥させる。

10

【0037】

プローブを、pH 7の70%ホルムアミド (フルカ (FLUKA)) / 2SSCにおいて70 $^{\circ}$ で10分間変性させる。標的DNA、すなわちスライドガラス上の核を、同じ条件で3分間変性させる。次に、スライドガラスを2SSCによってすすぎ、一連のアルコール浴において脱水する。プローブを37 $^{\circ}$ で一晩ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後の洗浄は2SSC緩衝液において72 $^{\circ}$ で5分間行う。

20

【0038】

ジゴキシゲニン標識またはビオチン標識プローブを用いる場合、プローブの検出は、異なる蛍光色素 (緑色と赤色) にカップリングさせた抗体を用いて行う。

【0039】

蛍光色素によって直接標識したプローブを用いる場合、スライドガラスはDAPI (1  $\mu$ g/ml、モレキュラープローブス (Molecular Probes)) によって染色して、p-フェニルジアミンに直接封入することができる。

【0040】

プローブからの蛍光シグナルを検出および定量する方法

本発明に従って染色体間不均衡を検出する系において用いられる画像サイトメトリー装置1は、図2を参照して、蛍光顕微鏡2、3、積分時間が40 ms ~ 10 msの範囲である冷却白黒CCDカメラ5、光源と顕微鏡3とのあいだに、選択的に顕微鏡3とCCDカメラ5のあいだに配置された、蛍光プローブの励起および放出光スペクトルを自動的に変化させる装置4 (電動フィルター回転盤または電動フィルタータレット)、ならびに系統的サンプリングのために装置1によって自動的に制御されるX-およびY-電動試料スライド台13を含む獲得成分10と、特に画像獲得板を含むコンピューターからなる制御処理成分14とを含む。

30

【0041】

蛍光の測定は、二段階に分けられる：

- 1) 調べるスライドガラス上での分析領域の定義後の画像の獲得および保存。
- 2) 画像の分析およびそれが由来するデータの処理。

40

【0042】

第一段階は、分析可能な核500~1000個を得るために、例えば倍率40倍の対物レンズによって、定義された表面積の限界内で、所定の数の視野を獲得することからなる。画像は、選択的干渉光学フィルターを用いてCCDカメラによって獲得する。それぞれの視野に関して、様々な蛍光色素 (青、緑、赤) の波長に対応する三つの画像平面を保存して重ね合わせる (図2)。観察した視野の焦点がぼやけないように参照点を確立する。このように、検出を行うスライドガラス11および対照スライドガラス12を、同じ条件で分析する (特に、同じ積分時間および同じカメラの獲得)。

【0043】

核の検出およびシグナルの定量を含む第二の段階において、図3を参照して以下を行う：

50

- 1) 蛍光強度を測定する対比染色平面、例えばDAPI平面上での核のマスクを確立できるように、凝集物からの核の分離、ならびに同様に大きさおよび形態の基準による人工産物の排除を含む、それぞれの画像の分離と分析すべき核の検出。
- 2) シグナルの形状および位置に関する如何なる仮説もなく、用いたプローブのそれぞれから放出された蛍光に対応する、それぞれの核内部での各蛍光色素（赤および緑）に関する積分強度の定量。
- 3) それぞれの色および核の外側のそれぞれの視野に関するバックグラウンドレベルの定量；参考としての最も一般的なノイズレベルの決定。
- 4) プローブのそれぞれに関して核におけるバックグラウンドレベル（参考値）を差し引く。
- 5) それぞれの核に関してバックグラウンドレベルに関して補正した緑／赤強度比の計算。
- 6) 例えばヒストグラムまたは「スキャッタープロット」（二つの色の強度値の二次元表示）の形でのデータの表示。
- 7) 集団分析、すなわち点の集団を分析してこれらの点の集団の重力の中心を決定する方法によって選択した核の集団に関する蛍光比の値の平均値および標準偏差の自動的決定。

10

## 【0044】

蛍光比は、同じようにおよび同じ条件でそれぞれの試料に関して計算する。このように、対照試料に関して標準化した場合に、患者からの試料の蛍光比が1.5である場合、トリソミー-21が検出される。

20

## 【0045】

当然、本発明は、まさに記述した例に限定されず、多くの変更をこれらの実施例に導入することができ、それらも本発明の意味に含まれる。本発明に従う検出法はこのように、他の染色体：X、Y、13、および18等の他の再発性の低い異常に拡大することができる。

## 【0046】

検出システムは以下を特徴とする：

- 画像サイトメトリ装置はまた、核を検出して、多数の波長の蛍光シグナルを定量する手段を含む；
- 検出および定量手段は、形状、大きさ、蛍光密度に関する多数の基準、通常、形態測定および密度測定基準と呼ばれる基準に基づいて分析の基礎に基づいて核をセグメント化して、測定面の全ての場のマスクを形成するように組織化される。

30

## 【0047】

参照文献

**Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT.**

Rapid prenatal diagnostics of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. *Fetal Diagn Ther* 1999; 14:193-197.

**Pierluigi M, Perfumo C, Cavani S, Lehrach H, Nizetic D, Dagna Bricarelli F.** An improved method for the detection of Down's syndrome aneuploidy in uncultured amniocytes. *Clin Genet* 1996; 49:32-36. 10

**Ruangvutilert P, Delhanty JD, Rodeck CH, Harper JC.** Relative efficiency of FISH on metaphase and interphase nuclei from non-mosaic trisomic or triploid fibroblast cultures. *Prenat Diagn* 2000; 20:159-162.

**Soloviev IV, Yurov YB, Vorsanova SG, Fayet F, Roizes G, Malet P.** Prenatal diagnostics of trisomy 21 using interphase fluorescence in situ hybridization of post-replicated cells with site-specific cosmid and cosmid contig probes. *Prenat. Diag* 1995; 15: 237-248. 20

**Steinborn A, Röddiger S, Born HJ, Baier P, Halberstadt E.** Fluorescent-in-situ-hybridization allows rapid prenatal detection of fetal aneuploidies within few hours. *Z Geburtsh Neonatol* 1996; 200:186-190.

**Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP.** Recent trends in the prevalence of down syndrome in north-eastern France. *Ann Génét* 1994; 37: 179-183. 30

**Stoll C, Alernbik Y, Dott B, Roth MP.** Study of Down Syndrome in 238942 consecutive births. *Ann. Génét* 1998; 41:44-51.

**Thein ATA, AbdelFattah SA, Kyle PM, Soothill PW.** An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogeneticists in prenatal diagnostics. *Prenat Diagn* 2000; 20:275-280. 40

**Tkachuk DC, Pinkel D, Kuo W.L, Weier A-U, Gray J.W,** Clinical applications of fluorescence *in situ* hybridation. Genetic analysis techniques and applications 1991 April No. 2 New York, US.

**Van Opstad D, van Hemel JO, Eussen BH, van der Heide A, van den Berg C, In 'T Veld PA, Los FJ.** A chromosome 21-specific cosmid cocktail for the detection of chromosome 21 aberrations in interphase nuclei. *Prenat Diagn* 1995, 15:705-711.

**Verma L, Macdonald F, Leedham P, MacConachi M, Dhanjai S, Hulten M.** Rapid and simple prenatal DNA diagnostics of Down's syndrome. *Lancet* 1998; 352:9-12.

**Wei HJ, Su TH, Chien CL, Tzeng CR.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) as a method to detect aneuploid cells. *Fetal Diagn Ther* 1997; 12:309-312.

10

20

【図面の簡単な説明】

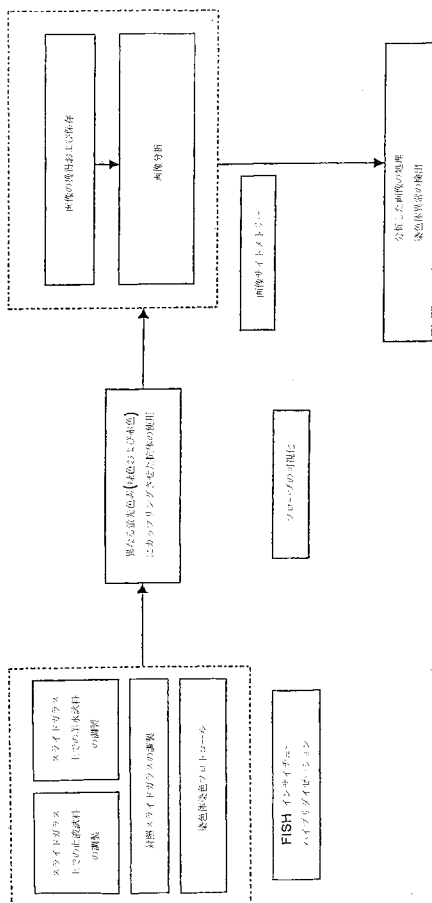
【0048】

【図1】本発明に従う染色体間不均衡を検出する方法の主な相を説明する。

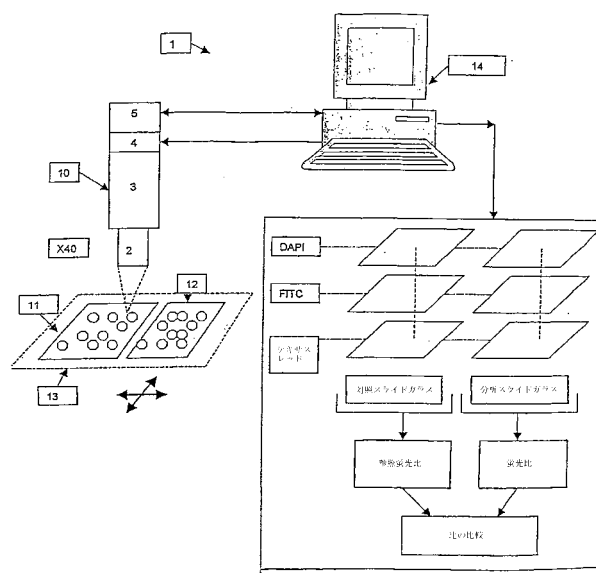
【図2】本発明に従う検出システムの構造の略図を示す。

【図3】本発明に従う検出システムによって獲得された画像について行われた検出および定量操作を表すフローチャートである。

【図1】



【図2】





【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 janvier 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/004700 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68

Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75005 Paris (FR). COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/02317

(22) Date de dépôt international : 3 juillet 2002 (03.07.2002)

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SOUS-SALINE, Françoise [FR/FR]; 1, rue Cassini, F-75014 Paris (FR). MALFOY, Bernard [FR/FR]; 33, rue Croulebarbe, F-75013 Paris (FR). DUTRILLAUX, Bernard [FR/FR]; 33, rue Charlot, F-75003 Paris (FR). GUILLY, Marie-Noëlle [FR/FR]; 17, rue du Docteur Magnan, F-75013 Paris (FR). TRUONG, Khuong [FR/FR]; 125, rue de la Glacière, F-75013 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité : 01/08803 3 juillet 2001 (03.07.2001) FR

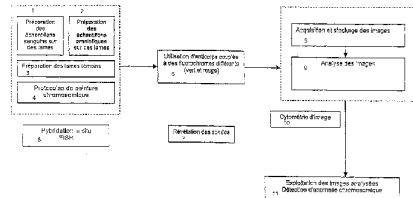
(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IMSTAR [FR/FR]; 60, rue Notre Dame des Champs, F-75006 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazolles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR DETECTING INTER-CHROMOSOMAL IMBALANCE BY FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) ON INTERPHASE NUCLEI

(54) Titre : PROCÉDE ET SYSTEME DE DETECTION DE DESEQUILIBRE INTER-CHROMOSOMIQUE PAR HYBRIDATION IN SITU DE SONDES FLUORESCENTES (FISH) SUR DES NOYAUX CELLULAIRES EN INTERPHASE



- 1. PREPARING FLUORESCENT PROBES
- 2. PREPARING ANALYTIC SAMPLES ON SLIDES
- 3. PERFORMING CONTROL TESTS
- 4. CHROMOSOMAL FISH PROTOCOLS
- 5. IN SITU HYBRIDIZATION
- 6. USE OF AN IMAGE ACQUISITION SYSTEM WITH CHROMOSOMAL ANALYSIS
- 7. IMAGE PROCESSING
- 8. ACQUISITION AND STORAGE OF IMAGES
- 9. IMAGE ANALYSIS
- 10. IMAGE STORAGE
- 11. PROCESSING IMAGE AND DETECTION OF CHROMOSOMAL ANOMALY

(57) Abstract: The invention concerns a system for detecting chromosomal imbalance by in situ hybridization of fluorescent probes on interphase nuclei, comprising the following phases: hybridizing in situ fluorescent probes on two separate chromosomes; exposing each probe with a different fluorochrome; measuring the intensity signals corresponding respectively to each probe thus exposed, on an assembly of nuclei, said measurement being carried out within a control cell population and within a cell population subjected to detection; calculating a ratio between the signals corresponding to each of the probes, said ratio calculation being carried out on said control cell population to provide a reference ratio and said population subjected to detection; comparing the fluorescence ratio corresponding to the population subjected to detection with the reference ratio; and processing the result of said comparison to detect an inter-chromosomal imbalance.

[Suite sur la page suivante]



WO 03/004700 A1

WO 03/004700 A1 

- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, GU, HK, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :  
avec rapport de recherche internationale  
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet européen (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), brevet
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : Procédé de détection de déséquilibre chromosomique par hybridation in situ de sondes fluorescentes sur des noyaux cellulaires en interphase, comprenant les phases suivantes : -une hybridation in situ de sondes fluorescentes sur deux chromosomes distincts, -une révélation de chaque sonde par un fluorochrome différent, -une mesure de signaux d'intensité correspondant respectivement à chaque sonde ainsi révélée, sur un ensemble de noyaux, cette mesure étant effectuée d'une part au sein d'une population cellulaire témoin et d'autre part au sein d'une population cellulaire soumise à détection, -un calcul du rapport entre les signaux correspondant respectivement à chacune des sondes, ce calcul de rapport étant effectué d'une part sur ladite population cellulaire témoin pour fournir un rapport de référence, et d'autre part, sur ladite population cellulaire soumise à détection, -une comparaison du rapport de fluorescence correspondant à la population cellulaire soumise à détection avec le rapport de référence, et -un traitement du résultat de cette comparaison pour détecter un déséquilibre inter chromosomique.

Procédé et système de détection de déséquilibre interchromosomique  
par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) sur des noyaux  
cellulaires en interphase

5 La présente invention concerne un procédé de détection de déséquilibre inter  
chromosomique par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) sur des  
noyaux cellulaires en interphase. Elle vise également un système mettant en œuvre ce  
procédé.

10 Les déséquilibres chromosomiques constitutionnels les plus récurrents que l'on  
retrouve chez les nouveau-nés concernent les chromosomes 21, 18, 13 et les  
chromosomes sexuels. La trisomie 21 (syndrome de Down) est l'anomalie la plus  
récurrente : environ 1,7 enfant sur 1000 est atteint (Stoll *et al*, 1998).

15 Le nombre de cas de trisomie 21 augmente avec l'âge de la mère, en particulier  
après 35 ans, et un examen prénatal est conseillé en cas de maternité tardive. Il existe  
une tendance actuelle à la maternité tardive : le pourcentage de femmes ayant un  
enfant à plus de 35 ans est passé de 8 % à 19 % en quatre ans (Stoll *et al*, 1994). On  
peut estimer que ce pourcentage va encore augmenter, mais dès à présent, le nombre  
de naissances en France étant de 750.000 par an, le besoin de tests de la trisomie 21  
est, potentiellement, de l'ordre de 150.000 par an.

20 Depuis les années 70, le diagnostic prénatal après amniocentèse est  
généralement réalisé en utilisant la cytogénétique classique, qui permet d'établir les  
caryotypes sur chromosomes métaphasiques, et ainsi de détecter un nombre anormal  
de chromosomes. Le délai d'attente entre le moment du prélèvement et le résultat du  
diagnostic relativement long (2 semaines) constitue l'inconvénient principal de cette  
25 technique. En outre, l'obtention de métaphases exploitables n'est pas assurée dans  
100 % des cas (1% d'échecs) et de faux négatifs peuvent apparaître à cause de la  
présence de cellules maternelles (Verma *et al*, 1998).

30 Plus récemment, l'hybridation *in situ* sur des sondes fluorescentes (FISH) a  
permis de travailler directement sur noyaux interphasiques sans avoir recours à la  
culture cellulaire. Cette technique consiste à marquer des chromosomes (voir par  
exemple US 5 756 696) ou des régions chromosomiques à l'aide de sondes  
fluorescentes et à compter les signaux, c'est-à-dire les chromosomes émettant des  
signaux fluorescents (Pierluigi *et al*, 1996 ; Steinborn *et al*, 1996 ; Wei *et al*, 1997 ;

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 2 -

Eiben *et al.*, 1999). On peut ainsi obtenir des résultats dans un temps assez court (quelques jours), et l'analyse peut être réalisée sur un petit nombre de cellules prélevées (quelques centaines) alors que la mise en culture cellulaire nécessite un nombre de cellules plus élevé (à partir de quelques dizaines de milliers).

5 Différents types de sondes ont été utilisés pour ces études : des sondes couvrant la région centromérique ou des régions du bras long du chromosome 21 (cosmides, YAC) (Soloviev *et al.*, 1995, Van Opstad *et al.*, 1995 ; Pierluigi *et al.*, 1996 ; Steinborn *et al.*, 1996). Le marquage partiel du chromosome 21 avec ces sondes permet d'évaluer le nombre de copies. Il faut donc procéder à un comptage des signaux,  
10 manuel ou automatique, pour détecter les cellules ayant trois signaux correspondant au chromosome 21.

Plusieurs études montrent la faisabilité technique de l'hybridation *in situ* sur les cellules fœtales. Cependant, il y a peu d'études qui donnent des résultats de comparaison directe entre la technique FISH et le diagnostic par cytogénétique  
15 classique (Pierluigi *et al.*, 1996 ; Steinborn *et al.*, 1996 ; Wei *et al.*, 1997 ; Eiben, *et al.*, 1999 ; Thein *et al.*, 2000). Les auteurs de ces études évoquent des concordances de 97-100% entre les deux approches, mais soulignent également les difficultés d'interprétation des résultats en FISH interphasique. Ces difficultés sont essentiellement liées à la nécessité d'un opérateur humain qui reconnaît et compte les  
20 signaux fluorescents. Or, la variabilité certaine entre différents opérateurs et surtout la signification statistique du nombre de noyaux avec un nombre anormal de signaux posent des problèmes en matière de diagnostic. La variabilité inter observateur vient des différents critères de définition d'un 'spot' (c'est-à-dire du signal fluorescent), par exemple sa taille, son intensité, sa texture, mais également du fait que les spots  
25 se trouvent souvent dans différents plans focaux, selon l'axe vertical Z dans le noyau.

Les résultats peuvent donc différer de manière significative en fonction de ces critères, qui eux-mêmes dépendent de la préparation de l'échantillon dans chaque laboratoire. Un biais important est constitué par l'établissement du « cut-off », c'est-à-dire de la valeur du « seuil de positivité » à partir de laquelle l'échantillon est  
30 considéré comme anormal (Ruangvutilert *et al.*, 2000). Cette valeur est difficile à établir, car le pourcentage de noyaux ayant trois signaux dans les cas témoins peut varier entre 10 et 20% des noyaux analysés. Ce chiffre varie en fonction des études car le nombre de cellules analysées peut varier lui-même de 50 à 200, ce qui explique

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 3 -

cette variabilité statistique. De plus, il peut être important pour l'interprétation médicale de ce test de connaître de façon fiable la valeur de la proportion de noyaux portant une anomalie de nombre de chromosomes (mosaïque).

Le but de la présente invention est de proposer un procédé de détection automatisé qui, par sa conception même, élimine ainsi les difficultés liées à la lecture par un opérateur humain, et procure une solution aux problèmes concernant la variabilité de la préparation des échantillons, qui jusqu'à présent, affectaient l'analyse.

Cet objectif est atteint avec un procédé de détection, utilisant un système informatisé, de déséquilibre interchromosomique par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) sur des noyaux cellulaires en interphase, comprenant les phases suivantes :

- une hybridation *in situ* de sondes fluorescentes sur deux chromosomes distincts,
- une révélation de chaque sonde par un fluorochrome différent,
- une mesure de signaux d'intensité correspondant respectivement à chaque sonde ainsi révélée, sur un ensemble de noyaux, cette mesure étant effectuée, d'une part, au sein d'une population cellulaire témoin et, d'autre part, au sein d'une population cellulaire soumise à détection,
- un calcul du rapport entre lesdits signaux correspondant respectivement auxdites sondes, ce calcul de rapport étant effectué, d'une part, sur ladite population cellulaire témoin pour fournir un rapport de référence et, d'autre part, sur ladite population cellulaire soumise à détection,
- une comparaison du rapport entre signaux correspondant à la population cellulaire soumise à détection avec le rapport de référence, et
- un traitement du résultat de cette comparaison pour détecter un déséquilibre interchromosomique.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par hybridation *in situ* une technique permettant de repérer une séquence d'ADN (ou d'ARN) au moyen d'une sonde de séquence spécifique homologue à celle étudiée. Elle est fondée sur la complémentarité des nucléotides (A/T, A/U, G/C), elle peut être réalisée en conditions physicochimiques précises sur des préparations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires. Le résultat du processus d'hybridation *in situ* est la

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 4 -

formation d'un hybride entre une sonde et une cible. L'hybridation *in situ* inclut une étape de dénaturation, l'étape à proprement parlé, d'hybridation *in situ* de la sonde sur la cible, et une étape de détection de l'hybride ou de la sonde. Dans le cadre de l'hybridation fluorescente *in situ*, les sondes sont marquées avec un fluorophore et l'hybridation est révélée par un marquage fluorescent. Le développement récent de cette technique permet la visualisation simultanée, sur la même préparation, de plusieurs sondes révélées chacune par un fluorophore différent.

La mesure de deux ou plusieurs signaux correspondant respectivement à chaque sonde est avantageusement effectuée par cytométrie d'image. Deux sondes peuvent par exemple être révélées respectivement par un fluorochrome vert et par un fluorochrome rouge.

On a ainsi développé une approche par cytométrie d'image qui associe les avantages de l'analyse par FISH sur noyaux interphasiques à ceux d'une lecture des signaux rapide, précise, quantitative et objective, car indépendante de l'opérateur.

Cette approche consiste à utiliser des peintures chromosomiques ou de régions chromosomiques pour le chromosome présentant un déséquilibre d'une part et pour un autre chromosome (autosome ou chromosome sexuel) d'autre part, ce dernier étant choisi de sorte à ce que le signal d'hybridation obtenu avec la peinture chromosomique soit comparable à celui obtenu avec la peinture du chromosome présentant un déséquilibre. Dans la pratique le chromosome de référence et le chromosome présentant un déséquilibre sont dans la mesure du possible de taille voisine. Ainsi, par exemple, la présente approche consiste à utiliser des peintures chromosomiques ou de régions chromosomiques pour le chromosome 21, d'une part, et, par exemple, pour le chromosome 20 ou le chromosome 22, d'autre part ; les chromosomes 20 ou 22 étant pris comme référence car le signal d'hybridation obtenu avec une peinture du chromosome 21 est comparable à celui obtenu avec une peinture du chromosome 20 ou du chromosome 22 qui sont de taille voisine. Pour la trisomie du chromosome 13 (par exemple : trisomie 13), le chromosome de référence est de préférence choisi parmi les chromosomes 14 et 15. Pour une aneuploïdie du chromosome 18 (par exemple trisomie 18), le chromosome de référence est de préférence choisi parmi les chromosomes 17, 19 et 20. Pour l'aneuploïdie du chromosome X, le chromosome de référence est par exemple choisi parmi les chromosomes 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Pour l'aneuploïdie du chromosome Y,

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 5 -

le chromosome de référence est de préférence choisi parmi les chromosomes 19, 20, 21, 22.

Selon un mode préféré de réalisation, les sondes mises en œuvre dans l'hybridation *in situ* sont des sondes de peinture chromosomique. On entend désigner par « sonde de peinture chromosomique » ou « peinture chromosomique » une sonde ou à une composition de sondes qui est adaptée pour hybrider, sous les conditions d'hybridation, avec une cible qui comprend un chromosome prédéterminé d'un génome multi-chromosomique. Si seulement une fraction d'un tel chromosome est présente dans l'échantillon subissant une telle hybridation avec une telle composition de sondes, alors cette fraction s'hybride et est identifiée. En pratique, une sonde peinte peut être mélangée avec une seconde, une troisième, etc... pour permettre le marquage et la détection simultanés de deux, de trois, etc...chromosomes prédéterminés. Différentes sondes de peinture sont actuellement commercialisées (GIBCO-BRL ; ONCOR ; BOEHRINGER-MANHEIM ; etc...) Elles sont préparées par amplification par IRS-PCR (voir par exemple WO 00 22164), par DOT-PCR utilisant des amorces PCR dégénérées de chromosomes, ou à partir de fragments de chromosomes isolés par tri chromosomique, par cytométrie de flux ou par microdissection de chromosomes. Alternativement, les sondes mises en œuvre dans la présente invention sont des sondes couvrant la région centrométrique (ADN satellite  $\alpha$ ), tout ou partie d'un bras chromosomique (séquences télomériques par exemple TTAGG<sub>n</sub>) ou spécifique de séquences d'ADN répétées spécifiques d'un ou plusieurs chromosomes (ADN satellite classique 1, 2 et 3).

Selon un mode préféré de réalisation, les sondes de peinture chromosomique sont marquées par une entité non isotopique tels les agents luminescents, les colorants, et autres. Ce marquage peut se faire de manière indirecte en marquant les sondes avec des enzymes, la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxigénine, les haptènes et autres qui seront révélés par des agents luminescents ou des colorants. Les agents luminescents, selon la source d'énergie d'excitation, peuvent être classés en radio luminescents, chémiluminescents, bioluminescents et photo-luminescents (incluant fluorescents et phosphorescents). Le terme « fluorescent » se réfère en général à la propriété d'une substance (telle un fluorophore) de produire de la lumière lorsqu'elle est excitée par une source énergétique telle que la lumière ultra-

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 6 -

violette par exemple. De façon plus préférée, les sondes sont marquées par un fluorophore.

Dans la présente invention, les inventeurs proposent de détecter un déséquilibre interchromosomique dans n'importe quelles cellules en interphase  
5 animales ou humaines, de préférence dans les cellules fœtales, provenant de liquide amniotique ou du sang maternel. La détection des déséquilibres chromosomiques constitutionnels ou acquis (cancers) peut également se faire par exemple dans les cellules du sang circulant, dans les cellules de la peau, dans les cellules buccales et plus généralement dans tout types cellulaires aisément disponibles pour réaliser un  
10 test diagnostic.

Dans la présente invention, les inventeurs proposent de détecter un déséquilibre interchromosomique, à la place d'une détection du nombre de copies du chromosome analysé :

- après hybridation *in situ* des sondes pour le chromosome 21 et 22 (par  
15 exemple), chaque sonde est révélée par un fluorochrome différent (en vert et en rouge) ;

- à l'aide d'un système informatisé de cytométrie d'image, les intensités de chaque sonde sont mesurées sur un minimum de quelques centaines (par exemple, 500) noyaux, après leur reconnaissance par le système, au sein d'une population  
20 cellulaire témoin et d'une population à tester ;

- le calcul du rapport entre les deux signaux d'intensité de chacune des sondes permet, en le comparant au cas normal de référence, de déterminer la présence d'au moins un chromosome surnuméraire (le chromosome 21 par exemple). Le déséquilibre interchromosomique est alors supérieur à 1, et de 1,5 dans le cas d'une  
25 trisomie. Le calcul du rapport entre les deux signaux d'intensité de chacune des sondes permet également en le comparant au cas normal de référence, de déterminer la présence de monosomie chromosomique. Le déséquilibre interchromosomique serait alors de 0,5.

Les avantages du procédé de détection selon l'invention en comparaison avec  
30 les procédés de détection actuels sont les suivants :

- du fait de l'utilisation de la technique FISH, le procédé de détection selon l'invention permet d'éviter tous les inconvénients liés à la culture cellulaire, et permet d'obtenir le résultat plus rapidement (en quelques jours) et sur un nombre de

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 7 -

cellules qui est à la fois statistiquement significatif et non contraignant pour des échantillons pauvres en cellules (entre 500 et quelques milliers de cellules).

- Toutes les difficultés liées à la lecture et à l'interprétation par un opérateur humain disparaissent avec ce procédé, car l'analyse est effectuée automatiquement par un système informatisé. En particulier, la reconnaissance des noyaux interphasiques, dans lesquels la mesure des intensités de fluorescence totale liée à l'hybridation de chaque sonde rend l'analyse beaucoup plus simple et plus robuste que celle utilisant la reconnaissance et le dénombrement des signaux fluorescents, actuellement proposée (comptage de taches ou « *spot counting* » in Tkachuk *et al* ,

1991). Par ailleurs, même si l'utilisation de sondes de petites tailles donnent des signaux de meilleure résolution pour le comptage, les dits signaux sont alors plus facilement confondus avec le bruit de fond, le rapport signal sur bruit est donc inférieur, d'autant plus que les liquides amniotiques contiennent des voiles protéiques, important source de bruit de fond. L'approche des inventeurs, utilisant des peintures chromosomiques assure un rapport signal sur bruit plus important que les méthodes mettant en œuvre le dénombrement de signaux de petite taille (dénombrement de sondes centromériques, en particulier), grâce à la taille du signal obtenu.

L'évaluation et la soustraction du bruit de fond permettent la détection des cellules trisomiques dans des conditions difficiles, du fait des caractéristiques des prélèvements amniotiques.

De plus, les problèmes concernant la variabilité de la préparation des échantillons n'affectent plus l'analyse. Un changement éventuel des conditions expérimentales ne changerait pas le rapport de fluorescence, car les deux signaux seront affectés de la même manière. Il est possible de détecter la présence de deux populations au sein d'une population cellulaire avec une meilleure fiabilité grâce à la meilleure précision statistique, du fait du plus grand nombre de noyaux qu'il est possible d'analyser rapidement. Ceci permet de distinguer des cas avec une contamination de cellules maternelles ou des cas mosaïques (cas où seule une fraction des cellules fœtales montrent l'anomalie).

- Enfin, on détecte avec une meilleure fiabilité les cas particuliers comprenant des iso chromosomes 21 ou encore des translocations t (21; 21) (Stoll *et al*, 1998),

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 8 -

quelle que soit la nature du chromosome remanié. L'utilisation de peinture chromosomique montre une tache qui devrait doubler de taille et d'intensité; la mesure par une caméra adaptée demeure plus précise compte tenu de la taille du signal. Cette approche est susceptible d'être applicable sur les autres pathologies concernant les chromosomes 13, 18, les chromosomes sexuels, mais également d'autres pathologies où sont présents des déséquilibres de nombre de chromosomes (monosomie, trisomie, quadrisomie, ..., polysomie). Il est à noter que la technique FISH d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes a déjà été mise en œuvre dans un procédé différent divulgué dans la demande de brevet publiée sous le numéro FR2783253 pour détecter un déséquilibre intrachromosomique dans des noyaux cellulaires en interphase plus précisément pour détecter une perte, ou un gain de matériel génétique (délétion, insertion, amplification, duplication...) de tout ou partie d'un bras chromosomique. Dans ce procédé de détection, deux sondes marquées par deux fluorochromes différents et respectivement spécifiques du bras long et du bras court d'un chromosome est hybridé sur ce même chromosome.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé selon l'invention, la phase de mesure comprend une première étape d'acquisition, dans un plan de mesure défini, d'un nombre donné de champs de façon à obtenir, pour un grossissement d'image donné, au moins un nombre prédéterminé (plusieurs centaines ou milliers) de noyaux analysables.

L'étape d'acquisition comprend en outre une capture, à l'aide de filtres successifs optiques à bande passante étroite, de plusieurs images correspondant, pour chaque champ d'observation, respectivement à une pluralité de plans correspondant aux longueurs d'onde d'une pluralité de fluorochromes (par exemple: 4,6-Diamidino-2-phénylindole (DAPI) avec une fluorescence bleue, Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) avec une fluorescence verte et le Texas Red™ avec une fluorescence rouge), un stockage de ces images acquises et une superposition desdites images acquises et stockées.

Suivant un autre aspect de l'invention, il est proposé un système pour détecter des déséquilibres de domaines chromosomiques par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes sur des noyaux cellulaires en interphase, mettant en œuvre le procédé selon l'invention, comprenant :

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 9 -

- des moyens pour réaliser une hybridation *in situ* de sondes fluorescentes sur deux chromosomes distincts,
  - des moyens pour révéler chaque sonde par un fluorochrome différent,
  - un dispositif pour mesurer des signaux d'intensité correspondant respectivement à chaque sonde ainsi révélée, sur un ensemble de noyaux, d'une part au sein d'une population cellulaire témoin et d'autre part au sein d'une population cellulaire soumise à détection,
  - des moyens pour calculer le rapport entre lesdits signaux correspondant respectivement auxdites sondes, d'une part sur ladite population cellulaire témoin pour fournir un rapport de référence, et d'autre part sur ladite population cellulaire soumise à détection,
  - des moyens pour comparer le rapport entre signaux correspondant à la population cellulaire soumise à détection avec le rapport de référence, et
  - des moyens pour traiter le résultat de cette comparaison en vue de détecter un déséquilibre interchromosomique.
- Le dispositif de cytométrie d'image comprend avantageusement :
- des moyens de microscopie à multiple fluorescence appliqués à des populations cellulaires préalablement soumises à une hybridation *in situ* de différentes sondes fluorescentes,
  - des moyens pour acquérir des ensembles d'images produites par les moyens de microscopie à fluorescence,
  - des moyens pour stocker lesdites images acquises, et
  - des moyens pour analyser lesdites images acquises et stockées.
- les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition d'image coopèrent pour acquérir, dans un plan de mesure défini, un nombre donné de champs, de façon à obtenir, pour un grossissement d'image donné, au moins un nombre prédéterminé de noyaux analysables.
- Dans une configuration préférée d'un système de détection selon l'invention, celui-ci comprend en outre des moyens de filtrage coopérant avec les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition pour acquérir plusieurs images correspondant, pour chaque champ, respectivement à une pluralité de plans correspondant aux longueurs d'onde d'une pluralité de fluorochromes (par exemple : DAPI, FITC (vert), Texas Red (rouge).

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 10 -

Par ailleurs, les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition peuvent avantageusement coopérer pour acquérir dans un même plan d'étude des images correspondant à une population cellulaire témoin et des images correspondant à une population cellulaire soumise à détection.

5

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à l'examen de la description détaillée d'un mode de mise en œuvre nullement limitatif, et des dessins annexés sur lesquels :

10 la figure 1 illustre les phases principales du procédé de détection de déséquilibre chromosomique selon l'invention ;

la figure 2 représente de façon schématique la structure d'un système de détection selon l'invention ; et

15 la figure 3 est un organigramme représentatif des opérations de détection et de quantification réalisées sur les images acquises par le système de détection selon l'invention.

20 On va en premier lieu décrire, dans le cadre d'un exemple de mise en œuvre du procédé de détection selon l'invention, les phases initiales de préparation et d'hybridation qui précèdent la phase de détection et de quantification, notamment en référence à la figure 1.

#### 25 **Préparation des échantillons**

Les échantillons à tester, actuellement issus de liquide amniotique, sont préparés comme pour une analyse cytogénétique classique sur lame, qu'il s'agisse de prélèvements mis en culture ou analysés directement. Cependant, pour améliorer  
30 l'analyse automatique des lames, l'utilisation d'une centrifugeuse à puits permettant l'étalement ponctuel sur lame (par exemple une cytospin<sup>TM</sup>) est recommandée pour un étalement plan des cellules. Ceci permet de réduire le nombre de cellules "hors

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 11 -

focus<sup>®</sup> lors de la lecture automatique. L'étalement limité diminue également le temps d'acquisition des images.

Les échantillons amniotiques cultivés sont traités selon les protocoles de diagnostics prénataux classiques. Pour l'analyse des liquides en direct, un traitement à la pepsine est suivi d'un traitement avec milieu dissociant les amas de cellules.

L'étalement est également fait à l'aide d'une centrifugeuse à puits. Les lames témoins peuvent être préparées à partir de liquides amniotiques normaux ou des fibroblastes normaux selon le même protocole. En outre, l'analyse peut également porter sur des échantillons sanguins. Dans le cas d'un prélèvement issu de sang périphérique maternel, la détection des cellules fœtales est faite au préalable.

#### Préparation des sondes

L'hybridation *in situ* peut être effectuée selon les protocoles habituels pour les peintures chromosomiques (Truong *et al.*, 1998). Les lames sont d'abord incubées 15 minutes dans une solution saline 2SSC suivis d'un rinçage au tampon PBS, d'un traitement à la pepsine dans 0,01 N (4 µg/ml, SIGMA) HCl pendant 10 minutes. On arrête la digestion par un bain de PBS pendant 5 minutes, on fixe les lames pendant 10 minutes dans le Carnoy (Ethanol/Acide Acétique, 3 :1 (V/V)) et on sèche les lames à l'air.

La sonde est ensuite dénaturée pendant 10 minutes à 70°C dans 70% Formamide (FLUKA)/2SSC à pH 7. L'ADN cible, c'est-à-dire les noyaux sur lames sont dénaturés dans les mêmes conditions pendant 3 minutes. Les lames sont ensuite rincées au 2SSC et déshydratées dans une série de bains d'alcool. L'hybridation de la sonde est effectuée la nuit à 37°C. Les lavages post-hybridation sont effectués à 72°C pendant 5 minutes dans du tampon 2SSC.

Dans le cas d'utilisation de sondes marquées à la digoxigénine ou à la biotine, la détection des sondes se fait par une utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes différents (vert et rouge).

Dans le cas d'utilisation de sondes directement marquée avec des fluorochromes, on peut procéder tout de suite à la coloration des lames dans du DAPI (1 µg/ml, Molecular Probes) et au montage dans du p-phenyl-diamine.

**Méthode de détection et quantification des signaux fluorescents des sondes**

Le dispositif de cytométrie d'image 1, mis en œuvre dans le système de  
5 détection de déséquilibre inter chromosomique selon l'invention, comprend, en  
référence à la figure 2, une partie d'acquisition 10 incluant un microscope à  
fluorescence 2, 3, une caméra CCD 5 refroidie noir et blanc permettant des temps  
d'intégration allant de 40 ms à 10 s, un dispositif (roue porte filtre motorisée ou  
10 tourelle porte filtre motorisée) permettant de changer automatiquement les spectres  
de lumière d'excitation et d'émission par les sondes fluorescentes 4 disposées entre  
la lampe et le microscope 3 et, éventuellement, entre le microscope 3 la caméra CCD  
5, et une platine porte-lame échantillons motorisée en X et Y 13, automatiquement  
contrôlée par le dispositif 1 pour l'échantillonnage systématique, et une partie de  
15 contrôle et de traitement 14 constituée d'un ordinateur comprenant, en particulier,  
une carte d'acquisition d'images.

La mesure de fluorescence est décomposée en deux étapes :

1) Acquisition et stockage des images, après définition d'une région  
d'analyse sur la lame étudiée.

20 2) Analyse des images et exploitation des données qui en sont issues.

La première étape consiste à acquérir, dans les limites d'une surface définie,  
un nombre de champs donnés, à l'objectif permettant, par exemple, un grossissement  
de 40x, de manière à obtenir 500 à 1000 noyaux analysables. Les images sont  
acquises à l'aide d'une caméra CCD grâce aux filtres optiques interférentiels sélectif.  
25 Pour chaque champ, trois plans images correspondant aux longueurs d'onde des  
différents fluorochromes ( bleu, vert, rouge) sont stockés et superposés (figure 2).  
Des points de repères sont établis pour éviter que les champs observés soient hors  
focus. Ainsi, on analyse les lames soumises à détection 11 et la lame témoin 12 dans  
les mêmes conditions (en particulier, même temps d'intégration et même gain de  
30 caméra).

Lors de la deuxième étape qui inclut la détection des noyaux et la  
quantification des signaux, on procède comme suit, en référence à la figure 3:

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 13 -

- 1) Segmentation de chaque image et détection des noyaux à analyser, incluant une séparation de noyaux en amas, ainsi que l'exclusion des artefacts par des critères de taille et de morphologie), permettant d'établir un masque des noyaux sur le plan de contre coloration, par exemple en DAPI, dans lequel les intensités de fluorescence sont mesurées.
- 2) Quantification de l'intensité intégrée à l'intérieur de chaque noyau pour chaque fluorochrome (rouge et vert), correspondant à la fluorescence émise par chacune des sondes utilisées, sans aucune hypothèse sur la forme et la localisation des signaux.
- 3) Quantification du niveau de fond pour chaque couleur et chaque champ en dehors des noyaux; détermination du niveau de bruit le plus fréquent comme référence.
- 4) Soustraction du niveau de fond (valeur de référence) dans les noyaux pour chacune des sondes.
- 5) Calcul du rapport d'intensité vert/rouge, corrigé du niveau de fond, pour chaque noyau.
- 6) Représentation des données, par exemple sous forme d'histogramme ou de « scatterplot » (représentation bidimensionnelle des valeurs d'intensités des deux couleurs).
- 7) Détermination automatique de la moyenne et de l'écart type des valeurs du rapport de fluorescence pour une population de noyaux choisie par analyse de clusters, c'est-à-dire par une méthode d'analyse de nuages de points et détermination des centres de gravité de ces nuages de points.
- Le rapport de fluorescence est calculé pour chaque échantillon de la même manière et dans les mêmes conditions. Une trisomie 21 est ainsi détectée lorsque le rapport de fluorescence pour l'échantillon du malade normalisé par rapport à l'échantillon témoin est de 1,5.
- Bien sûr, l'invention n'est pas limitée aux exemples qui viennent d'être décrits et de nombreux aménagements peuvent être apportés à ces exemples sans sortir du cadre de l'invention. Le procédé de détection selon l'invention peut ainsi être étendu à d'autres chromosomes : X, Y, 13 et 18 ou encore d'autres anomalies moins récurrentes.

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 14 -

Le système de détection est caractérisé en ce que :

- le dispositif de cytométrie d'image comprend en outre des moyens pour détecter des noyaux et quantifier des signaux en fluorescence de multiples longueurs d'onde ;
- 5 - les moyens de détection et de quantification sont agencés pour segmenter des noyaux à partir d'une analyse sur critères multiples de forme, dimension, densité de fluorescence, usuellement appelés critères morphométriques et densitométriques, donnant lieu à la création d'un masque pour l'ensemble des champs d'un plan de mesure.

10

15

20

25

30

35

40

## Références

- 5 **Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT.** Rapid prenatal diagnostics of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. *Fetal Diagn Ther* 1999 ; 14 :193-197.
- Pierluigi M, Perfumo C, Cavani S, Lehrach H, Nizetic D, Dagna Bricarelli F.** An improved method for the detection of Down's syndrome aneuploidy in uncultured
- 10 amniocytes. *Clin Genet* 1996 ;49 :32-36.
- Ruangvutilert P, Delhanty JD, Rodeck CH, Harper JC.** Relative efficiency of FISH on metaphase and interphase nuclei from non-mosaic trisomic or triploid fibroblastes cultures. *Prenat Diagn* 2000 ;20 :159-162.
- Soloviev IV, Yurov YB, Vorsanova SG, Fayet F, Roizes G, Malet P.** Prenatal
- 15 diagnostics of trisomy 21 using interphase fluorescence in situ hybridization of post-replicated cells with site-specific cosmid and cosmid contig probes. *Prenat Diagn* 1995; 15: 237-248.
- Steinborn A, Röddiger S, Born HJ, Baier P, Halberstadt E.** Fluorescent-in-situ-hybridization allows rapid prenatal detection of fetal aneuploidies within few hours. *Z Geburtsh Neonatol* 1996; 200: 186-190.
- 20 **Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP.** Recent trends in the prevalence of down syndrome in north-eastern France. *Ann Génét* 1994; 37: 179-183.
- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP.** Study of Down syndrome in 238942 consecutive births. *Ann Génét* 1998; 41: 44-51.
- 25 **Thein ATA, AbdelFattah SA, Kyle PM, Soothill PW.** An assessment of the use of interphase FISH with chromosome spécifique probes as an alternative to cytogénétiens in prenatal diagnostics. *Prenat Diagn* 2000 ;20: 275-280.
- Tkachuk DC, Pinkel D, Kuo W.L, Weier A-U, gray J.W.** Clinical applications of fluorescence *in situ* hybridation. *Genetic analysis techniques and applications* 1991
- 30 April N°2 New York, US.
- Van Opstad D, van Hemel JO, Eussen BH, van der Heide A, van den Berg C,** In 'T Veld PA, Los FJ. A chromosome 21-specific cosmid cocktail for the detection of

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 16 -

chromosome 21 aberrations in interphase nuclei. *Prenat Diagn* 1995, 15 :705-711.

**Verma L, Macdonald F, Leedham P, MacConachie M, Dhanjai S, Hulten M.**  
Rapid and simple prenatal DNA diagnostics of Down's syndrome. *Lancet*  
1998 ;352 :9-12.

- 5 **Wei HJ, Su TH, Chien CL, Tzeng CR.** Fluorescence in situ hybridization (FISH)  
as a method to detect aneuploid cells. *Fetal Diagn Ther* 1997 ; 12 :309-312.

10

15

20

25

30

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 17 -

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection de déséquilibre interchromosomique par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes sur des noyaux cellulaires en interphase, comprenant les phases suivantes :

- une hybridation *in situ* de sondes fluorescentes sur deux chromosomes distincts,
- une révélation de chaque sonde par un fluorochrome différent,
- une mesure de signaux d'intensité correspondant respectivement à chaque sonde ainsi révélée, sur un ensemble de noyaux, cette mesure étant effectuée d'une part au sein d'une population cellulaire témoin et d'autre part au sein d'une population cellulaire soumise à détection,
- un calcul du rapport entre lesdits signaux correspondant respectivement auxdites sondes, ce calcul de rapport étant effectué d'une part, sur ladite population cellulaire témoin pour fournir un rapport de référence, et d'autre part, sur ladite population cellulaire soumise à détection,
- une comparaison du rapport entre signaux correspondant à la population cellulaire soumise à détection avec le rapport de référence, et
- un traitement du résultat de cette comparaison pour détecter un déséquilibre interchromosomique.

20

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mesure des deux signaux correspondant respectivement à chaque sonde est effectuée par cytométrie d'image automatisée.

25

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les deux sondes sont révélées respectivement par deux fluorochromes différents (par exemple un fluorochrome vert et un fluorochrome rouge).

30

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les signaux d'intensité de chaque sonde sont mesurés sur un nombre pouvant être défini par l'opérateur, par exemple de quelques centaines de noyaux.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la phase de mesure comprend une première étape d'acquisition, dans un

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 18 -

plan de mesure défini, d'un nombre donné de champs de façon à obtenir, pour un grossissement d'image donné, au moins un nombre prédéterminé de noyaux analysables.

5           6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'étape d'acquisition comprend en outre une acquisition, par des filtrages optiques successifs, de plusieurs images correspondant, pour chaque champ, respectivement à une pluralité de plans correspondant aux longueurs d'onde d'une pluralité de fluorochromes (par exemple le bleu pour la contre coloration, le vert, et le rouge pour le marquage des sondes), un  
10           stockage desdites images acquises et une superposition desdites images acquises et stockées.

              7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'étape d'acquisition est effectuée dans des conditions d'acquisition sensiblement identiques  
15           pour une population cellulaire témoin et une population cellulaire soumise à détection.

              8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les acquisitions correspondant aux populations cellulaires respectivement témoin et soumises à  
20           détection sont effectuées sur deux champs inclus dans un même plan de mesure.

              9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la phase de mesure comprend en outre une seconde étape pour détecter des noyaux et quantifier des signaux d'intensité de fluorescence.  
25

              10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'étape de détection et de quantification comprend une segmentation des noyaux dans chaque champ inclus dans un plan de mesure.

30           11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la segmentation des noyaux inclut une séparation de noyaux en amas.

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 19 -

12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que la segmentation des noyaux inclut une élimination des artéfacts par des critères de morphologie et de taille.
- 5 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que l'étape de détection et de quantification comporte une quantification de l'intensité du signal de fluorescence intégrée à l'intérieur de chaque noyau pour chaque couleur correspondant à chaque sonde.
- 10 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'étape de détection et de quantification comporte en outre un calcul du niveau de fond pour chaque couleur en dehors des noyaux dans chacun des champs.
- 15 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape de détection et de quantification comporte en outre une détermination du niveau de fond le plus fréquent comme valeur de référence de bruit et une correction par ladite valeur de référence de l'intensité de signal fluorescent quantifiée à l'intérieur de chaque noyau.
- 20 16. Système pour détecter des déséquilibres chromosomiques par hybridation in situ de sondes fluorescentes sur des noyaux cellulaires en interphase, mettant en œuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant :
- 25 - des moyens pour réaliser une hybridation in situ de sondes fluorescentes sur deux chromosomes distincts,
- 30 - des moyens pour révéler chaque sonde par un fluorochrome différent,
- un dispositif pour mesurer des signaux d'intensité correspondant respectivement à chaque sonde ainsi révélée, sur un ensemble de noyaux, d'une part au sein d'une population cellulaire témoin et, d'autre part, au sein d'une population cellulaire soumise à détection,
- des moyens pour calculer le rapport entre lesdits signaux correspondant respectivement auxdites sondes, d'une part sur ladite population cellulaire témoin pour fournir un rapport de référence, et, d'autre part, sur ladite population cellulaire

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 20 -

- soumise à détection,
- des moyens pour comparer le rapport entre signaux correspondant à la population cellulaire soumise à détection avec le rapport de référence, et
  - des moyens pour traiter le résultat de cette comparaison en vue de détecter un déséquilibre inter chromosomique, même en cas de mosaïque.

17. Système de détection selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il inclut, au titre des moyens de mesure, un dispositif de cytométrie d'image.

18. Système de détection selon la revendication 17, caractérisé en ce que le dispositif de cytométrie d'image comprend :

- des moyens de microscopie à fluorescence appliqués à des populations cellulaires préalablement soumises à une hybridation in situ de sondes fluorescentes,
- des moyens pour acquérir des images produites par les moyens de microscopie à fluorescence,
- des moyens pour stocker lesdites images acquises, et
- des moyens pour analyser lesdites images acquises et stockées.

19. Système de détection selon la revendication 18, caractérisé en ce que les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition d'image coopèrent pour acquérir, dans un plan de mesure défini, un nombre de champs, de façon à obtenir, pour un grossissement d'image donné, au moins un nombre prédéterminé de noyaux analysables.

20. Système de détection selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens de filtrage coopérant avec les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition pour acquérir plusieurs images correspondant, pour chaque champ, respectivement à une pluralité de plans correspondant aux longueurs d'onde d'une pluralité de fluorochromes (par exemple, le DAPI (bleu) pour la contre coloration, le FITC (vert), le Texas Red™ (rouge) pour les sondes).

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 21 -

21. Système de détection selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce que les moyens de microscopie à fluorescence et les moyens d'acquisition coopèrent pour acquérir dans un même plan d'étude des images correspondant à une population cellulaire témoin et des images correspondant à une population cellulaire soumise à détection.

22. Système de détection selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que le dispositif de cytométrie d'image comprend en outre des moyens pour détecter des noyaux et quantifier des signaux en fluorescence de multiples longueurs d'onde.

23. Système de détection selon la revendication 22, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour segmenter des noyaux à partir d'une analyse morphométrique et densitométrique, donnant lieu à la création d'un masque pour l'ensemble des champs d'un plan de mesure.

24. Système de détection selon les revendications 22 ou 23, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour séparer les noyaux en amas.

25. Système de détection selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour exclure des artefacts par des critères de taille et de morphologie.

26. Système de détection selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour quantifier l'intensité des signaux de fluorescence intégrée à l'intérieur de chaque noyau pour chaque couleur.

27. Système de détection selon l'une des revendications 22 à 26, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour calculer le niveau de fond pour chaque couleur en dehors des noyaux.

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

- 22 -

28. Système de détection selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisé en ce que les moyens de détection et de quantification sont agencés pour déterminer le niveau de fond le plus fréquent comme valeur de référence de fond et pour soustraire ladite valeur de référence sur l'intensité quantifiée à l'intérieur de chaque

5 noyau.

29. Application du procédé de détection inter chromosomique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, à des noyaux de cellules fœtales circulant dans le sang maternel.

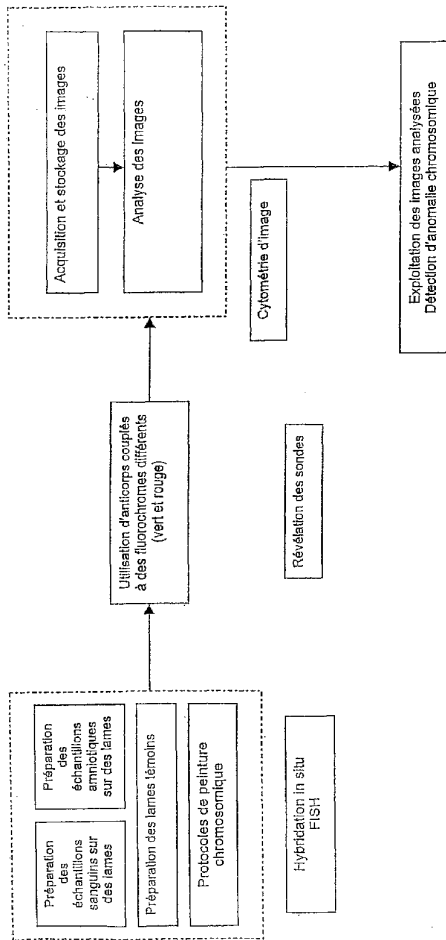


Figure 1

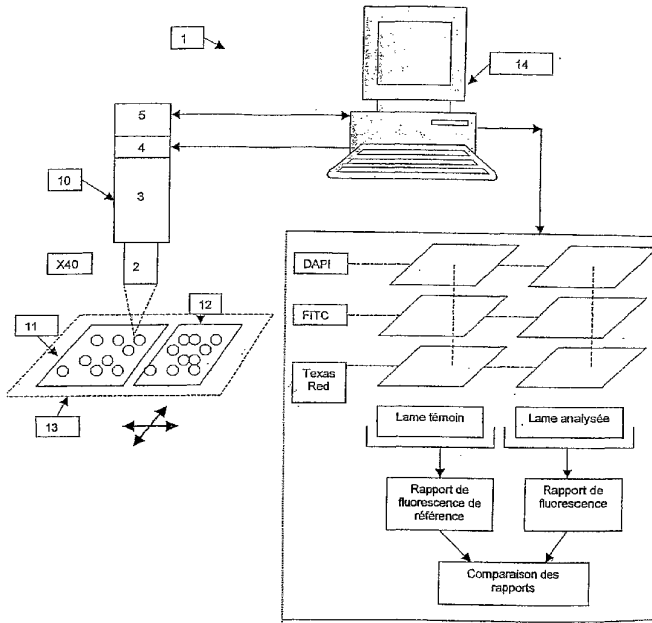


Figure 2

WO 03/004700

PCT/FR02/02317

3/3

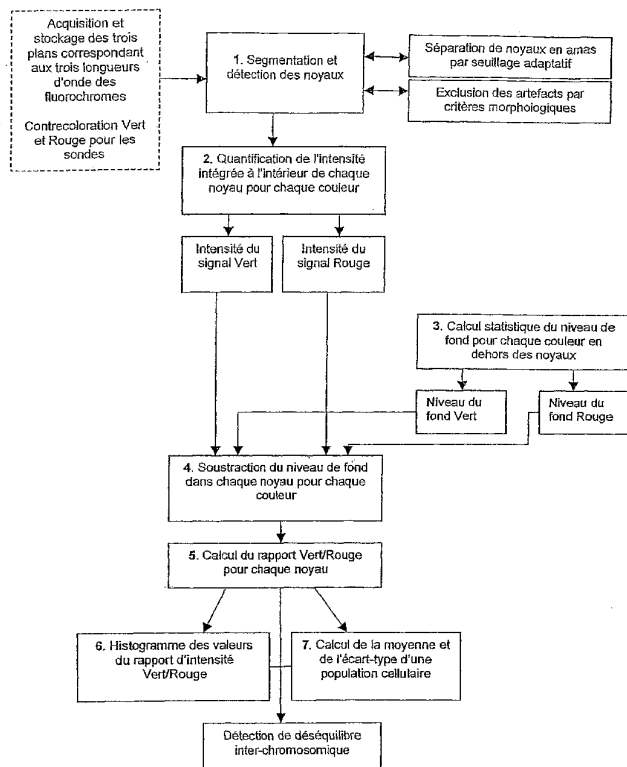


Figure 3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intc PCT/FR 02/02317
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 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 classificative symbols) IPC 7 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 783 253 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 17 March 2000 (2000-03-17) cited in the application	16-28
Y	the whole document	1-15, 29
X	TRUONG K ET AL: "Quantitative FISH by image cytometry for the detection of chromosome 1 imbalances in breast cancer: a novel approach analyzing chromosome rearrangements within interphase nuclei" LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, BALTIMORE, US, vol. 78, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1607-1613, XP002124037 ISSN: 0023-6837	16-28
Y	the whole document	1-15, 29
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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* documents 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) *C* 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 ** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 November 2002		11/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Reuter, U

Form PCT/ARW/20 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/02317
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 756 696 A (PINKEL DANIEL ET AL) 26 May 1998 (1998-05-26) column 49, line 57 -column 51, line 6 ---	1-15,29
A	WO 01 20044 A (US HEALTH ;BUDENDORF LUKAS (US); KONONEN JUHA (US); DOUGHERTY EDWA) 22 March 2001 (2001-03-22) page 3, line 18 -page 7; claims ---	1-29
A	AUBELE M ET AL: "COMPARATIVE FISH ANALYSIS OF NUMERICAL CHROMOSOME 7 ABNORMALITIES IN 5-MUM AND 15-MUM PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS FROM PROSTATIC CARCINOMA" HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 107, no. 2, 1997, pages 121-126, XPO01024090 ISSN: 0948-6143 page 123, right-hand column -page 124 page 126, left-hand column ---	1-29
A	US 5 714 325 A (BIANCHI DIANA W) 3 February 1998 (1998-02-03) example 4 ---	1-29
P,X	WO 01 77649 A (IMSTAR S A ;PAPINE ALEXANDRE (FR); SOUSSALINE FRANCOISE (FR)) 18 October 2001 (2001-10-18) the whole document ---	16-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inter- national Application No	
Information on patent family members				PCT/FR 02/02317	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
FR 2783253	A	17-03-2000	FR 2783253	A1	17-03-2000
			CA 2343107	A1	23-03-2000
			EP 1112380	A1	04-07-2001
			WO 0015841	A1	23-03-2000
			JP 2002525559	T	13-08-2002
US 5756696	A	26-05-1998	US 6132961	A	17-10-2000
			AT 176281	T	15-02-1999
			AU 647741	B2	31-03-1994
			AU 5898790	A	06-06-1991
			CA 2021489	A1	20-01-1991
			DE 69032920	D1	11-03-1999
			DE 69032920	T2	09-09-1999
			EP 0430402	A2	05-06-1991
			EP 0885971	A2	23-12-1998
			IE 902727	A1	05-06-1991
			IL 94906	A	31-10-1995
			JP 3224499	A	03-10-1991
			NZ 234529	A	23-12-1993
			NZ 245427	A	26-07-1994
			PT 94751	A	20-03-1991
			US 5721098	A	24-02-1998
			US 6344315	B1	05-02-2002
			US 6280929	B1	28-08-2001
			US 6159685	A	12-12-2000
			ZA 9005561	A	24-04-1991
US 5447841	A	05-03-1995			
CA 1301605	A1	26-05-1992			
WO 0120044	A	22-03-2001	AU 7494900	A	17-04-2001
			WO 0120044	A2	22-03-2001
US 5714325	A	03-02-1998	AU 7841694	A	10-04-1995
			AU 9718698	A	04-03-1999
			CA 2172504	A1	30-03-1995
			EP 0725833	A1	14-08-1996
			JP 9506763	T	08-07-1997
WO 9508646	A1	30-03-1995			
WO 0177649	A	18-10-2001	FR 2807543	A1	12-10-2001
			AU 4844901	A	23-10-2001
			WO 0177649	A1	18-10-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Den Internationale No PCT/FR 02/02317
<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 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 réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 783 253 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 17 mars 2000 (2000-03-17) cité dans la demande	16-28
Y	le document en entier	1-15,29
X	TRUONG K ET AL: "Quantitative FISH by image cytometry for the detection of chromosome 1 imbalances in breast cancer: a novel approach analyzing chromosome rearrangements within interphase nuclei" LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, BALTIMORE, US, vol. 78, no. 12, décembre 1998 (1998-12), pages 1607-1613, XP002124037 ISSN: 0023-6837	16-28
Y	le document en entier	1-15,29
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document antérieur, mais publié à l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date du dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telles qu'indiquées) *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 façon consistant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent. Il n'est pas revendiqué ne peut être considéré comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent. Il n'est pas revendiqué ne peut être considéré 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 *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
4 novembre 2002		11/11/2002
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.O. Box 5518 Patentlaan 2 NL - 6200 HV Maastricht Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3000		Fonctionnaire autorisé  Reuter, U

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Date internationale No PCT/FR 02/02317
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 756 696 A (PINKEL DANIEL ET AL) 26 mai 1998 (1998-05-26) colonne 49, ligne 57 -colonne 51, ligne 6 ---	1-15,29
A	WO 01 20044 A (US HEALTH ;BUDENDORF LUKAS (US); KONONEN JUHA (US); DOUGHERTY EDWA) 22 mars 2001 (2001-03-22) page 3, ligne 18 -page 7; revendications ---	1-29
A	AUBELE M ET AL: "COMPARATIVE FISH ANALYSIS OF NUMERICAL CHROMOSOME 7 ABNORMALITIES IN 5-MUM AND 15-MUM PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS FROM PROSTATIC CARCINOMA" HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 107, no. 2, 1997, pages 121-126, XPO01024090 ISSN: 0948-6143 page 123, colonne de droite -page 124 page 126, colonne de gauche ---	1-29
A	US 5 714 325 A (BIANCHI DIANA W) 3 février 1998 (1998-02-03) exemple 4 ---	1-29
P, X	WO 01 77649 A (IMSTAR S A ;PAPINE ALEXANDRE (FR); SOUSSALINE FRANCOISE (FR)) 18 octobre 2001 (2001-10-18) le document en entier -----	16-28

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den  
internationale No

PCT/FR 02/02317

Document breveté cité ou rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2783253 A	17-03-2000	FR 2783253 A1	17-03-2000
		CA 2343107 A1	23-03-2000
		EP 1112380 A1	04-07-2001
		WO 0015841 A1	23-03-2000
		JP 2002525559 T	13-08-2002
US 5756696 A	26-05-1998	US 6132961 A	17-10-2000
		AT 176281 T	15-02-1999
		AU 647741 B2	31-03-1994
		AU 5898790 A	06-06-1991
		CA 2021489 A1	20-01-1991
		DE 69032920 D1	11-03-1999
		DE 69032920 T2	09-09-1999
		EP 0430402 A2	05-06-1991
		EP 0885971 A2	23-12-1998
		IE 902727 A1	05-06-1991
		IL 94906 A	31-10-1995
		JP 3224499 A	03-10-1991
		NZ 234529 A	23-12-1993
		NZ 245427 A	26-07-1994
		PT 94751 A	20-03-1991
		US 5721098 A	24-02-1998
		US 6344315 B1	05-02-2002
		US 6280929 B1	28-08-2001
		US 6159685 A	12-12-2000
ZA 9005561 A	24-04-1991		
US 5447841 A	05-09-1995		
CA 1301605 A1	26-05-1992		
WO 0120044 A	22-03-2001	AU 7494900 A	17-04-2001
		WO 0120044 A2	22-03-2001
US 5714325 A	03-02-1998	AU 7841694 A	10-04-1995
		AU 9718698 A	04-03-1999
		CA 2172504 A1	30-03-1995
		EP 0725833 A1	14-08-1996
		JP 9506763 T	08-07-1997
		WO 9508646 A1	30-03-1995
WO 0177649 A	18-10-2001	FR 2807543 A1	12-10-2001
		AU 4844901 A	23-10-2001
		WO 0177649 A1	18-10-2001

Formulaire PCT/ISA/110 (deuxième famille de brevets) (juillet 1999)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 504007899

コミッサリア ア レネルジー アトミック  
フランス国 パリ リュ ドゥ ラ フェデレーション 3 3

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(72) 発明者 ソーサライン フランソワーズ

フランス国 パリ リュ カッシーニ 1

(72) 発明者 マルフォイ ベルナルド

フランス国 パリ リュ クローレバルベ 3 3

(72) 発明者 デュートリリュアックス ベルナルド

フランス国 パリ リュ シャルロット 3 3

(72) 発明者 ギリー マリー - ノエル

フランス国 パリ リュ ドゥ ドクター マンナン 1 7

(72) 発明者 トゥロング フォン

フランス国 パリ リュ ドゥ ラ グラシエレ 1 2 5

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 DA05 EA01 GA02 GA07 GB18 GB19 HA01

JA02 JA03 KA02 LA03 MA01 NA01 NA02 NA05

2G045 AA24 CB01 DA13 FA11 FB07

2G054 AA06 BA04 CA21 CE02 GA04

4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 HA08 HA12 HA14

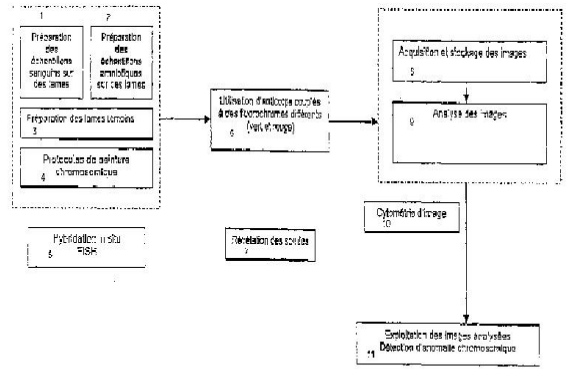
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR56 QR77 QR82

QS25 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	通过间期核的荧光原位杂交检测染色体间不平衡的方法和系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004535807A</a>	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003510458	申请日	2002-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	林星图等造型化战略分析现实中，它们和灰 法国国家科学研究中心 居里研究所等 提交SARRIA一个抗皱紧肤ATTO米克		
申请(专利权)人(译)	Imusuta图像等造型系统蒸发散：战略分析现实中，它们和灰 研究所Kyurie コミッサリア ア レネルジー アトミック		
[标]发明人	ソーサラインフランソワーズ マルフォイベルナルド デュートリリュアックスベルナルド ギリーマリーノエル トゥロングフォン		
发明人	ソーサライン フランソワーズ マルフォイ ベルナルド デュートリリュアックス ベルナルド ギリー マリーノエル トゥロング フォン		
IPC分类号	G01N21/64 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6841 G01N21/78 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q2537/143		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N21/64.E G01N21/64.F G01N21/78.C G01N33/483.C G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/DA05 2G043/EA01 2G043/GA02 2G043/GA07 2G043 /GB18 2G043/GB19 2G043/HA01 2G043/JA02 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/LA03 2G043/MA01 2G043/NA01 2G043/NA02 2G043/NA05 2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FA11 2G045 /FB07 2G054/AA06 2G054/BA04 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063 /QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001008803 2001-07-03 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明包括下面的步骤，通过在荧光探针的原位杂交间期核一种系统，用于检测染色体失衡；步骤杂交上原位两个不同染色体的荧光探针；分别阶段暴露于不同的荧光染料的探针；测量，控制细胞群，并在细胞群中进行检测，从而在暴露于核的聚集对应信号强度每个相应探针在测量步骤；种群进行检测；比率计算是进行群体进行控制细胞群和检测，以提供一个参考比率，计算对应于各探针的信号之间的比率将对应于参考比率的荧光比率与参考比率进行比较；检测平衡。



1. PREPARING BLOOD SAMPLES ON PLATES
2. PREPARING AMNIOTIC SAMPLES ON SLIDES
3. PREPARING CONTROL PLATES
4. CHROMOSOMAL PAINT PROTOCOLS
5. IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)
6. USE OF ANTIBODIES COUPLED WITH CH-FERENT FLUOROCROMES (GREEN AND RED)
7. EXPOSING PROBES
8. ACQUIRING AND STORING IMAGES
9. ANALYSING IMAGES
10. IMAGE CYTOMETRY
11. PROCESSING IMAGES AND DETECTION OF CHROMOSOMAL ANOMALY