



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Mise au point d'un système de détection de *Chlamydia trachomatis* au moyen de sondes nucléiques immobilisées sur plastic

Gerard, Véronique

*Award date:*  
1992

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Mise au point d'un système de détection de *Chlamydia trachomatis* au moyen de sondes nucléiques immobilisées sur plastic.**

Gérard Véronique

Résumé

Depuis quelques années, les sondes nucléiques ont fait leur apparition dans le domaine du diagnostic et font preuve d'un très grand succès. Elles permettent de détecter, avec une très grande spécificité des acides nucléiques viraux ou bactériens dans les cellules d'un organisme infecté. Les sondes marquées sont mises à hybrider avec la séquence cible de l'agent pathogène à détecter.

Les sondes radioactives présentant de nombreux inconvénients, sont vouées à disparaître au profit des sondes froides. Celles-ci font intervenir des systèmes enzymatiques permettant la révélation de la sonde par colorimétrie ou par luminescence. L'avantage de la luminescence est une très grande sensibilité de la détection et la facilité de sa mise en oeuvre.

Dans ce travail, nous avons développé un système d'hybridation dit en sandwich. Dans cette technique l'ADN cible est pris en sandwich entre la sonde marquée et une séquence d'ADN fixée de façon covalente sur le support (le trappeur). Le support utilisé est le plastique modifié (-NH) Covalink. Ces deux hybridations permettent ainsi une double spécificité de la détection. Les conditions d'hybridation en sandwich ont été mises au point dans ce travail en utilisant une sonde radioactive. Dans ces conditions, nous arrivons à détecter jusqu'à 26 atomoles d'ADN cible. Le passage à l'utilisation de sondes biotinylées et révélées en bioluminescence, a été introduit, mais se heurte à des problèmes de reconnaissance du conjugué. Il reste donc à l'optimiser.

Une année de mémoire ! Vous aurez largement assez de temps, disaient-ils. Il n'empêche que les douze coups de minuit annoncent ce premier décembre 1992 et qu'en même temps, mon mémoire terminé vient de voir le jour. Résultat d'une année de travail et de beaucoup d'apprentissage (à commencer par les dilutions !).

Je voudrais vous remercier, Mr Remacle, de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et vous témoigner ma reconnaissance pour le dévouement dont vous faites preuve envers les mémorants et, en général, envers tous les membres du laboratoire.

Merci à vous, Mr Lourtie, qui m'avez donné la chance de travailler sur ce sujet bien concret et, qui sait, un jour commercialisable. Bonne chance, et longue vie à Lamdatech!

Un tout grand merci à vous, Mr Goffinet, pour nous avoir laissé "squater" votre laboratoire. Merci, Kiki, pour ta gentillesse et pour avoir guidé mes premiers pas en génétique moléculaire. Merci, Marie-Claire pour les bons moments passés avec toi et le petit service de dernière minute (schut!). Merci, Mr Bescei, pour vos primers. Merci Danièle et Daniel, Than et Pascal, vous tous formez une très chouette équipe.

Merci, Thierry C. pour m'avoir fait connaître les spins colonnes.

Merci, Mr Oppendoes, pour votre recherche sur *Chlamydia* au début de ce mémoire, alors que je ne connaissais encore rien d'elle.

Bien qu'un peu plus loin de nous, je ne voudrais pas oublier de te remercier, Essam. Merci de nous avoir si bien pris en charge et de nous avoir appris à travailler en radioactivité. Merci à vous, Lindy Palmer, pour les précieux plasmides de *Chlamydia*.

Merci à vous deux, Nath et Bobo, compagnons d'hybridation, pour vos conseils.

Merci à nos deux piliers de laboratoire, Andrée chérie et Edouard. Que ferions-nous sans vous?

Merci, Sylviane de Bertogne, pour avoir partagé la pièce bioluminescente avec moi, Benoît pour m'avoir quelques fois dépêtrée du VAX, Marc toujours disponible, Martine pour sa compétence, à Olivier et ses jeux de mots, Thierry et son humour, Carine que je n'ai pu aider au SAS, Pierre, Marie-Denise, Maggi, Isabelle K., GG et Etienne.

Merci à toi, Piera la mamma pour l'ambiance que tu apportes là où tu vas.

Muchas gracias, Maria, por los palabras espanioles qué tu me has aprendido.

Merci à vous aussi mes parents et ma famille de m'avoir donné la chance de suivre ces études et de m'avoir épaulé durant ces cinq années. Merci, Jean-François, pour ton aide et tes conseils toujours très précieux.

Enfin, à celle qui au cours de cette année fut, tour à tour, mon assistante de biochimie, ma collègue, ma conseillère, mon amie et ma soeur. Isabelle, bien plus que ce mémoire, ta connaissance fait l'événement marquant de cette année mémorable. Merci de m'avoir si bien guidée dans ce travail et puisque je te dois une bonne partie de tout ce que j'ai appris durant cette année, c'est à toi que je le dédie. Encore un krès grand merci pour tout.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b>2</b>
<b>II. Les différents systèmes de détection existants</b>	<b>4</b>
<b>III. Théorie sur l'hybridation</b>	<b>7</b>
<b>III.1. Considérations générales</b>	<b>7</b>
<b>III.2. Facteurs influençant la stabilité des hybrides</b>	<b>8</b>
<b>III.3. Vitesse de formation des hybrides en solution</b>	<b>9</b>
<b>III.4. Facteurs influençant la vitesse de réaction</b>	<b>12</b>
<b>III.5. Aspect théorique de l'hybridation sur support solide</b>	<b>13</b>
<b>IV. Les différents techniques de révélation</b>	<b>16</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>18</b>
<b>I. Tampons, solutions stocks et milieux</b>	<b>19</b>
<b>II. Techniques de biologie moléculaire utilisées</b>	<b>21</b>
<b>II.1. Transformation bactérienne</b>	<b>21</b>
<b>II.2. Electrophorèse en gel d'agarose</b>	<b>22</b>
<b>A. Analytique</b>	<b>22</b>
<b>B. Préparative</b>	<b>23</b>
<b>II.3. Mesure de la concentration en ADN</b>	<b>24</b>
<b>II.4. Digestions enzymatiques</b>	<b>25</b>
<b>II.5. Techniques de PCR</b>	<b>26</b>
<b>A. Principe</b>	<b>26</b>
<b>B. Mise en oeuvre d'une PCR</b>	<b>27</b>
<b>C. Protocole standard d'une PCR</b>	<b>31</b>
<b>III. Phosphorylation, marquage et biotinylation d'ADN</b>	<b>32</b>
<b>III.1. Phosphorylation de l'extrémité 5' de l'ADN</b>	<b>32</b>
<b>III.2. Marquage radioactif d'ADN phosphorylé en 5'</b>	<b>33</b>
<b>III.3. Biotinylation d'ADN à l'extrémité 3'</b>	<b>34</b>

IV. Purification d'ADN sur spin colonne	35
V. Fixation covalente d'ADN simple brin	36
VI. Hybridation ADN-ADN sur plastic	37
VI.1. Hybridation simple	37
VI.2. Hybridation sandwich	38
VII. Révélation de la sonde biotinylée en bioluminescence	39
VIII. Détection de la sonde biotinylée en chémoluminescence	40
RESULTATS ET DISCUSSION	42
I. Etapes préliminaires à l'hybridation sur plastic	43
I.1. Stratégie d'hybridation choisie	43
I.2. Support solide choisi	44
I.3. Séquence d'ADN choisie	45
A. But du travail	45
B. Recherche d'une séquence plasmidique spécifique	46
II. Préparation des différents fragments d'ADN	47
II.1. Le plasmide de <i>Chlamydia trachomatis</i>	47
II.2. Production de 415pb par électrophorèse préparative	48
A. Transformation et maxiprep	48
B. Séparation du plasmide et de PBR322	48
C. Récupération du fragment de 415 pb	48
II.3. Production des différents fragments par PCR	49
A. Amplification du fragment 415pb	49
B. Amplification des 3 types de fragments par PCR	50
III. Marquage radioactif des différents fragments d'ADN	52
III.1. Marquage des fragments non phosphorylés	52
III.2. Marquage du fragment traqueur phosphorylé en 5'	52

<b>IV. Mise au point de la purification des fragments sur spin colonne</b>	<b>52</b>
<b>IV.1. Purification de l'ADN après marquage radioactif</b>	<b>53</b>
<b>IV.2. Purification d'ADN après PCR</b>	<b>54</b>
<b>IV.3. Conclusion</b>	<b>55</b>
<b>V. Fixation d'ADN trappeur sur plaque Covalink</b>	<b>55</b>
<b>V.1. Phosphorylation préalable du fragment</b>	<b>55</b>
<b>V.2. Explication de la réaction de fixation sur Covalink</b>	<b>56</b>
<b>A. La réaction</b>	<b>56</b>
<b>B. Remarques sur les fonctions amides de l'ADN</b>	<b>56</b>
<b>V.3. Optimisation de la fixation</b>	<b>56</b>
<b>A. Courbe de concentration d'ADN trappeur</b>	<b>56</b>
<b>B. Essais de différentes t° et solutions de lavage</b>	<b>57</b>
<b>C. Essai du NHS et différentes concentrations d'EDC</b>	<b>58</b>
<b>D. Etude du pH de la réaction</b>	<b>58</b>
<b>E. Etude des lavages</b>	<b>59</b>
<b>F. Importance de la purification</b>	<b>60</b>
<b>G. Conservation des puits coatés</b>	<b>61</b>
<b>VI. Hybridation simple</b>	<b>62</b>
<b>VI.1. Mise au point des conditions optimales</b>	<b>62</b>
<b>A. Etude du temps et de la stringence de l'incubation</b>	<b>62</b>
<b>B. Essai de solutions d'hybridation plus stringentes</b>	<b>63</b>
<b>C. Courbe de concentration en ADN cible</b>	<b>64</b>
<b>D. Etude des lavages</b>	<b>64</b>
<b>E. Conclusion</b>	<b>65</b>
<b>VII. Hybridation sandwich en radioactivité</b>	<b>65</b>
<b>VII.1. Chronologie des hybridations</b>	<b>66</b>
<b>VII.2. Optimisation de l'hybridation sandwich</b>	<b>66</b>
<b>A. Etude de l'excès de sonde à utiliser</b>	<b>67</b>
<b>B. Courbe de concentration en ADN cible</b>	<b>68</b>
<b>C. Optimisation de la t° et durée d'hybridation</b>	<b>69</b>

VIII. Hybridation sandwich en bioluminescence	70
VIII.1. Le système de révélation en bioluminescence	70
A. Rappel du principe	70
B. Le système Avidine-biotine	70
C. Le conjugué	71
D. La production d'ATP	71
E. Production de lumière	71
F. La biotinylation de la sonde	72
VIII.2. Courbe de concentration en ADN cible	72
VIII.3. Courbe de concentration en trappeur biotinylé	73
VIII.4. Essai avec le conjugué avidine-peroxydase	73
PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	75
BIBLIOGRAPHIE	78

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
Ag	antigène
AMP	adénosine monophosphate
AMP <sub>c</sub>	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
bp	paire de base ("base pair")
dCTP	déoxycytidine triphosphate
DEAE	diéthyl aminoéthane
DFA	direct fluorescent assay
DMSO	diméthyl-sulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
dUTP	désoxyuridine triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
ELISA	enzyme linked immuno sorbent
fm	femtomole
HRP	horse radish peroxydase
kb	kilobase
kd	kilodalton
MeIm	1- Méthylimidazol
NHS	N-hydroxysuccinimide
ORF	phase ouverte de lecture (open reading frame)
Oligo	oligonucléotide
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCHL2	Plasmide <i>Chlamydia</i> sérovar L2
PCR	polymerase chain reaction
Pi	phosphate inorganique
PK	Pyruvate Kinase
PM	poids moléculaire
pmole	picomole
PNK	polynucléotide kinase
RLU	relative light unit
RNase	ribonucléase
rpm	tour par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
SSC	Standard Saline Citrate
TBE	Tris borate EDTA
TE	Tris EDTA
UV	ultra-violet

**INTRODUCTION**

Selon l'adage populaire, il vaut mieux prévenir que guérir. Ceci est certainement correct, mais en médecine, il n'est pas possible de prévenir certaines infections (outre par une bonne hygiène) car tout simplement il n'existe pas de vaccins. Il faut alors guérir et pour cela savoir d'abord de quel agent pathogène il est question. C'est là qu'un diagnostic correct prend toute son importance en vue d'un traitement adéquat.

Depuis plusieurs années, on assiste à un essor dans le domaine de la détection de pathogènes en biologie clinique. De nombreuses techniques ont déjà été élaborées, ayant chacune leurs caractéristiques propres.

Le but de ce travail consiste en la mise au point d'un système de détection d'une bactérie pathogène (à savoir *Chlamydia trachomatis*) en bioluminescence à l'aide de sondes nucléiques.

Après avoir donné quelques informations concernant *Chlamydia*, nous examinerons les principaux systèmes de détection et de révélation existant afin de situer exactement l'objectif de ce mémoire et de comprendre les divers éléments qui ont servis à son développement.

## I. CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Classées parmi les microorganismes bactériens coccoïdes et Gram négatifs, les *Chlamydiales* sont avec les *Coxiellales* et les *Rickettsiales* les quelques rares ordres de bactéries intracellulaires obligatoires. En effet, comparables aux virus, elles sont incapables de générer par elles-mêmes de l'ATP et détournent donc celui de la cellule hôte. Ceci explique la très petite taille de leur génome qui est un des plus petit génome procaryotes ( $4-6 \times 10^8$  daltons). Ceci leur a valu jadis d'être classées parmi les virus (M. Comanducci *et al.* 1990).

Elles possèdent un cycle de vie complexe caractérisé par l'alternance de deux formes. La forme infectieuse, dite corps élémentaire (CE), est dénuée d'activité métabolique et survit plus ou moins bien dans le milieu extérieur jusqu'à la rencontre d'une cellule adéquate. Après s'être fixée aux récepteurs de la membrane, elle induit sa phagocytose par la cellule. Une fois à l'intérieur, le CE se réarrange en corps réticulé (CR), la deuxième forme de la bactérie.

Genre	CHLAMYDIA				
Espèce	trachomatis			psittaci	pneumoniae
biotype	trachome		LVG	souris	
sérotype	A à C	D à K	L1,L2,L3		
	infection oculaire	infection sexuelle	infection lymphatique		
% homologie de séquence par rapport à la séquence du trachome (la référence)	100%		96-97%	30-60%	>10%

Figure n°I.1 : Tableau de classification du genre *Chlamydia* .

*Chlamydia psittaci* : infection des macrophages des alvéoles pulmonaires, du foie et de la rate provoquant des pneumonies et asphyxies progressives.

*Chlamydia pneumoniae* : infection des cellules épithéliales des poumons provoquant des pharyngites, des bronchites et des pneumonies.

Table  
Differentiation of the three biovars of *Chlamydia trachomatis*\*

Characteristics	Biovar		
	Trachoma	Lympho- granuloma venereum	Mouse
Natural host:			
Humans	+	+	-
Mice	-	-	+
Preferred site of infection in natural hosts:			
Squamocolumnar epithe- lium cells	+	-	-
Lymph nodes	-	+	-
Lungs	-	-	+
Behavior in laboratory ani- mals:			
Intracerebral lethality for mice	-	+	-
Follicular conjunctivitis in primates	+	-	-
Behavior in cell culture:			
Plaques in L cells	-	+	+
Infection markedly en- hanced by:			
Centrifugation onto cell sheet	+	-	-
Treatment of host cells with diethyl- aminoethyl-dex- tran	+	-	-
No. of serovars	12	3	NA
% DNA homology with tra- choma	100	100	30-60

\* Symbols: see standard definitions; also NA = data not available.

Figure n°I.2 : Tableau reprenant les caractéristiques des trois biotypes de *Chlamydia trachomatis* (Storz et Page 1971)

Celui-ci métaboliquement actif, se multiplie par fission binaire pour, au bout de deux à trois jours, constituer un stock d'une centaine de CE. Ces derniers détruisent la cellule pour se répandre à l'extérieur et infecter d'autres cellules.

Outre leur génome de petite taille, les *Chlamydia* possèdent un plasmide (de 7,5 kb contenant 9 ORF) répété en 7 à 10 exemplaires par spécimen. Nul ne connaît sa fonction, mais sa séquence étant très hautement conservée entre les différents biotypes de l'espèce *C.trachomatis*, on suppose un rôle essentiel sinon vital pour la bactérie (Palmer et Falkow 1986). Comme dans beaucoup d'autres organismes infectieux où le plasmide code pour des fonctions liées à la pathogénicité (fonction de conjugaison, de résistance aux antibiotiques), il se peut qu'il ait un rôle dans la croissance de la bactérie à l'intérieur de la cellule eucaryote. Le plasmide apparaît en effet entre 24 et 48 heures après l'infection de la cellule mais n'a jamais pu être détecté dans la forme extracellulaire de la bactérie. Les fonctions du plasmide ne seraient exprimées qu'à un stade spécifique de l'infection: pendant la croissance et la différenciation du CE (M. Comanducci *et al.* 1988).

Le genre *Chlamydia* compte trois espèces reprises dans la figure I.1.

C'est à *Chlamydia trachomatis* infectieuse de l'homme que nous nous intéressons plus particulièrement. Les 15 sérotypes différents sont regroupés en deux biotypes en fonction des infections qu'ils provoquent (figure I.2).

Les sérotypes L1, L2, L3 sont responsables des lymphogranulomes vénériens, tandis que les sérotypes de A à C provoquent des infections oculaires, des conjonctivites qui peuvent aller jusqu'à l'ulcération de la cornée entraînant la cécité.

Enfin, les sérotypes de D à K sont responsables des infections des voies sexuelles et urinaires provoquant chez l'homme des épидидimites et chez la femme des inflammations pelviennes, de l'urètre et du col utérin pouvant, en cas de complications, mener à la salpingite et la stérilité. Les mères infectées peuvent transmettre le germe à leur enfant au moment de l'accouchement (fig.I.3).

Malgré les maladies sérieuses que peuvent causer *Chlamydia trachomatis*, les infections sont très souvent peu, ou même pas du tout, symptomatiques et cela plus couramment chez la femme que chez l'homme. Ce manque de symptômes rend l'identification clinique difficile et contribue à la dissémination de la maladie (Yang *et al.* 1991).

Ainsi, avec 350 millions de cas dans les pays en voie de développement (Dawson, C.R. Proceeding of the fifth International Symposium of human Chlamydial infection. Lund (Suède) 1982) et quelques 4 millions de cas par an

**Table 9.18.****Human diseases caused by *Chlamydia trachomatis***

Biovar	Disease or syndrome
Trachoma	Trachoma Inclusion conjunctivitis in newborns, children, and adults Otitis media Pneumonia in infants and normal (?) and immunosuppressed adults Nongonococcal urethritis in men Epididymitis Urethral syndrome in women Mucopurulent cervicitis Salpingitis Proctitis Perihepatitis and peritonitis (Fitz-Hugh-Curtis syndrome) in young women (?) Bartholinitis (?) Endocarditis (?)
Lymphogranuloma venereum	Lymphogranuloma venereum
Mouse	None

**Figure n°I.3 : Tableau reprenant les maladies causées par *Chlamydia trachomatis* chez l'homme (Storz et Page 1971).**

aux U.S.A (J.A.J.W. Kleytmans *et al* 1991), *Chlamydia trachomatis* est, outre le virus du SIDA, reconnue comme étant l'agent pathogène sexuellement transmissible le plus courant .

## II. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE DETECTION EXISTANTS

La méthode d'identification et de diagnostic des bactéries *Chlamydia* par culture cellulaire est la plus ancienne et reste la méthode standard par rapport à laquelle sont comparées les autres techniques (Lane J. Mercer, MD *et al.* 1990).

Elle consiste en l'infection de cellules en cultures (cellules Mc Coy) par des extraits de l'échantillon à tester suivie d'une observation au microscope permettant de détecter les inclusions intracellulaires éventuelles. Les inclusions sont mises en évidence par coloration à l'iode, giemsa ou encore à l'aide d'anti-corps fluorescents. Si au moins une inclusion est observée, le test est considéré comme positif (B. Dulith *et al.* 1991).

Avantages et désavantages.

La spécificité est excellente (100%) mais la sensibilité dépend :

- des conditions de stockage et de transport de l'échantillon qui doit rester vivant,
- des conditions de culture et de coloration qui ne doivent être toxiques ni pour l'organisme, ni pour la culture cellulaire,
- de la contamination éventuelle de la culture par d'autres organismes.

De plus, la culture est techniquement difficile et demande un personnel qualifié dans ce domaine (C.A. Gratton *et al.* 1990). Un autre inconvénient, outre son prix assez élevé, est la longue période d'incubation que demande les cultures. La culture de *Chlamydia* requiert environ 48 heures, mais celle d'autres organismes tels que les cytomégalovirus ou influenza peut demander jusqu'à une semaine (Leback 1987).

Beaucoup de laboratoires ne pouvant se permettre ces conditions, se sont tournés vers des méthodes plus simples et plus rapides telles que les techniques basées sur l'immunodétection. Il s'agit des tests ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) et DFA (direct fluorescent assay).

Ce procédé se base sur la reconnaissance spécifique des anticorps (Ac) vis

à vis de leur antigène (Ag). Ces Ac sont détectés par un des nombreux moyens de révélation existant (voir chapitre IV).

#### Avantages et désavantages.

Les tests ELISA sont simples et rapides (ce qui est très utile quand un grand nombre de tests doit être réalisé par jour) alors que les tests DFA requièrent un microscope coûteux et un personnel bien entraîné pour interpréter les résultats (J.M. Clyne *et al.* 1989). L'examen d'une coupe peut prendre environ 10 minutes. De ce fait, de faux négatifs peuvent résulter d'une examination trop rapide ainsi que des faibles positifs peuvent échapper à l'examineur. Un test positif peut aussi être masqué par des débris cellulaires. Dans les deux cas, ces tests ne sont pas recommandés pour tester une population à prévalance faible telle que les personnes immunodéprimées. En effet, de trop faibles quantités d'Ac ne permettent pas aux tests sérologiques courants d'en faire la détection. Par ailleurs, la détection antigénique utilisant des anticorps monoclonaux (Mab) peut être empêchée par la présence d'Ac dans l'échantillon qui peuvent se lier au site antigénique *in vivo*. Ainsi, en dépit de leur sensibilité, ces tests ne sont pas encore assez fiables.

Plus récemment, la technique de PCR (polymerase chain reaction) a fait son apparition dans le domaine du diagnostic. Le principe est une amplification d'ADN à partir des échantillons susceptibles de contenir l'ADN du pathogène à détecter. Les primers, séquences qui permettent d'amorcer la réaction, sont sélectionnés pour leur spécificité à l'organisme à détecter. Le produit de la PCR montre après électrophorèse une bande de longueur déterminée par les primers choisis si le test est positif. Dans le cas d'un échantillon négatif, l'absence d'ADN matrice spécifique aux primers, n'aura pu rendre possible l'amplification et la bande attendue ne sera pas présente sur le gel.

#### Avantages et désavantages.

Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter l'extraction ni la purification de l'ADN dont résultait une perte en ADN cible et une prolongation du temps de diagnostic. C'est actuellement la technique de détection la plus sensible vu sa très grande puissance à amplifier une séquence précise à partir d'une très faible quantité d'ADN matrice. Elle permet en effet de détecter une seule copie du plasmide de *Chlamydia tr.* après 40 cycles d'amplification (Ostergaard *et al.* 1990). Cependant, la taille

de la séquence amplifiée n'est pas un critère suffisant pour une identification précise et le gel d'agarose ne permet d'obtenir qu'une quantification approximative (J.C.Nicolas 1990). En outre, le plus gros désavantage de la PCR est le risque d'amplifier de l'ADN cible extérieur à l'échantillon, entraînant des faux positifs. Pour remédier à cela, des précautions drastiques doivent être prises comme travailler sous hotte ou sous système clos, avec un matériel et des solutions stériles. Idéalement, on travaille dans une pièce qui n'a jamais été exposée à l'ADN à mettre en évidence. Ces conditions très strictes rendent cette technique inapplicable à une détection de routine, sans compter qu'un test de routine doit rester à un prix abordable alors qu'une PCR revient à 100 francs par 100 $\mu$ l.

Pour toutes ces raisons, il était absolument nécessaire de développer des tests plus fiables et d'usage plus facile .

Depuis quelques années, la recherche s'oriente particulièrement vers les techniques d'hybridation de sondes nucléiques. Cette nouvelle approche est une révolution dans le domaine du diagnostic des maladies infectieuses. Elle est maintenant à la conquête du marché (elle a pris environ 25 % du marché entre 1987 et 1990).

Cette technique a été décrite pour la première fois par Nygaard et Hall (1964). Elle est basée sur la capacité d'un acide nucléique simple brin de se lier, sous certaines conditions expérimentales, à un polynucléotide (la sonde) de séquence complémentaire. Le duplex ainsi formé est très stable. En effet, la constante de dissociation (Kd) est de  $10^{-23}$  M pour un hybride de 273 pb alors que celle de la réaction Ag-Ac est de  $10^{-5}$  à  $10^{-9}$  M (Leback- 1987). La sonde, spécifique de l'ADN à détecter, est marquée soit radioactivement soit par une molécule directement ou indirectement détectable. L'échantillon qui peut être du sang, de l'urine, des fèces ou des frottis, se présente soit sous forme de solution soit fixé sur un support solide. Si l'ADN cible est présent, la sonde pourra s'hybrider à sa séquence complémentaire. L'hybride formé est alors détecté à l'aide du marqueur accroché à la sonde. De telles sondes ont déjà été développées pour une variété d'agents infectieux tels que *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania mexicana*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, Cytomégalovirus, adénovirus, le virus de l'hépatite B et les entérovirus (Leback 1987).

Leurs avantages par rapport aux autres techniques sont considérables:

- elles sont d'usage facile et donc applicables à des tests de routine
- elles présentent un seuil de détection de l'ordre du picogramme
- elles sont extrêmement fiables et améliorent la spécificité d'un facteur

100 à 1000 (voir 10000) fois par rapport aux tests immunologiques classiques. Leur grande spécificité permet en outre d'éviter les modulations antigéniques qui interviennent chez certains virus ou bactéries rendant les diagnostics immunologiques dépassés après quelques années.

Par ailleurs, cette technique ne nécessite pas d'échantillons vivants ni d'isolement et de purifications préalables (ce qui rend le test plus rapide). Une simple dénaturation de l'ADN cible et sonde est requise avant de procéder à l'hybridation. La production de sondes nucléiques est facile que se soit par bactéries recombinantes, par synthétiseur d'oligo ou par PCR. De plus elles ne nécessitent pas de passer par des animaux comme c'est le cas pour les Ac monoclonaux.

Enfin, la stabilité de l'ADN ne pose pas de problème; cette molécule est particulièrement solide et stable même à 4°C.

Il existe actuellement plusieurs techniques d'hybridation telles que l'hybridation *in situ*, en solution ou sur support solide (dot blot, southern blot). Les principaux support solides sont les membranes, les lames de verre, le plastique ou autres. Ces différentes techniques ont été décrites par Nathalie Zammateo (mémoire de licence FNDP Namur 1990).

Pour ce travail, nous avons choisi parmi toutes ces méthodes celle de l'hybridation sur support solide (plastique modifié) avec une stratégie d'hybridation dite en sandwich. Ce choix est expliqué au chapitre I des résultats et discussions.

### III. THEORIE SUR L'HYBRIDATION

#### III.1. CONSIDERATIONS GENERALES

La réaction d'hybridation peut se décomposer en deux parties : une première étape de nucléation dans laquelle de courtes séquences de bases complémentaires se rejoignent suivant des collisions au hasard (nucléation). Par la suite, l'appariement des autres bases adjacentes se réalise rapidement par une réaction en tirette avec formation d'une double hélice.

Du point de vue thermodynamique, une stabilité maximale de l'hybride est obtenue à partir de 49 paires de bases appariées. On estime ne rien

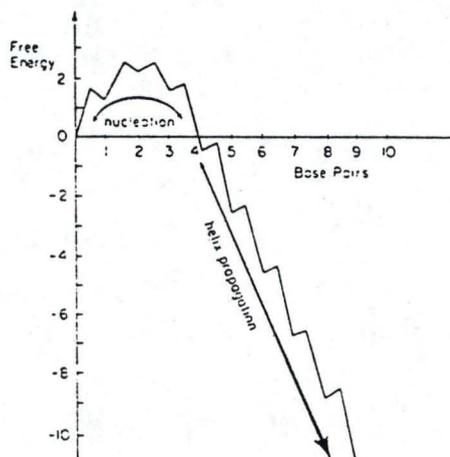


Figure 7.5 Energy profile of hybridization reaction. After the unfavourable positive free-energy contribution in the nucleation step is overcome, the free energy for additional steps becomes negative and the helix grows spontaneously. Relative total free energy of helix formation in arbitrary units is plotted as a function of the number of consecutive, stacked base pairs assembled into a helical array (After Saenger, 1954 and Porschke, 1977)

**Figure n°I.4 : Schéma expliquant la différence entre la cinétique de réaction qui dépend de la vitesse de nucléation et l'énergie libre de réappariement qui dépend du nombre de bases appariées (J. Remacle 1992)**

améliorer à l'hybridation au-delà de 100 paires de bases (pb) appariées. Au contraire, on peut en tirer certaines conséquences.

Les facteurs qui influencent la vitesse de réaction étant différents de ceux qui influencent la stabilité des hybrides, il est très important de les connaître. La vitesse va dépendre de la vitesse de nucléation, elle-même dépendante des conditions d'hybridation. La stabilité, par contre, va influencer la dissociation de l'hybride lors des lavages (figI.4).

### III.2. FACTEURS INFLUENCANT LA STABILITE DES HYBRIDES

La stabilité des hybrides est mesurée par la température de fusion ( $T_m$ ) qui représente la température à laquelle 50% des duplex sont dissociés sous forme monocaténaire. Le  $T_m$  a été étudié pour des hybridations en solution, mais lorsqu'un des deux brins est fixé sur un support, on estime que le  $T_m$  est plus bas (Kafatos et AL 1979). Le  $T_m$  dépend de plusieurs facteurs: température, force ionique, composition en bases et autres agents.

#### A. Stabilité des hybrides ADN-ADN

On peut estimer le  $T_m$  à partir de la formule suivante:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,61 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,72(\%F)$$

(d'après Howley et al., 1979 et Anderson et Young, 19..)

avec M = Force ionique (mole/l)

% GC = % de bases GC par rapport au total

% F = % de formamide dans la solution

% mismatch = % de bases non complémentaires entre les 2 chaînes.

Dans le cas de mismatch, il faut retirer  $1^\circ\text{C}$  pour chaque % de mismatch.

A savoir que :

- Chaque % de mismatch diminue la  $T_m$  de  $1^\circ\text{C}$  pour l'appariement d'ADN
  - La formule de  $T_m$  n'est valable qu'entre 0,01 et 0,4 M NaCl.
  - La relation avec la formamide dépend du % GC.
  - La réduction pour GC est de  $0,5^\circ\text{C}$  pour 1% formamide.  
La réduction pour AT est  $0,75^\circ\text{C}$  pour 1% formamide.
- La formule utilise 0,72, mais on peut aussi utiliser 0,6% .

### B. Stabilité pour les hybrides ADN-ARN

La formule proposée par Thomas et Dancis (1973) et Altar et al. (1989).est:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,61 \log M + 0,41 (\% \text{ GC}) - 820/L - 0,6 (\% \text{ F}) - 1,4 (\% \text{ mismatch})$$

avec la longueur de la sonde = L.

### C. Stabilité pour les oligonucléotides

Le  $T_m$  de petits nucléotides obtenu dans des conditions standards soit 0,9 M NaCl est :

$$T_m (^\circ\text{C}) = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

avec G, C, A, T le nombre de nucléotides dans l'oligo.

Température d'hybridation optimale =  $T_m - 5^\circ\text{C}$

L'effet du mismatch est ici très important et  $T_m$  diminue d'environ  $5^\circ\text{C}$  pour chaque paire de bases non correcte.

## III.3. VITESSE DE FORMATION DES HYBRIDES EN SOLUTION

(D'après Young et Anderson 1990.)

### A. Formule générale

Soit R la concentration de la sonde et D celle de l'ADN. On suppose le cas de l'ADN fixé sur le filtre et que l'on veut révéler grâce à une sonde (R).

La réaction d'hybridation est une réaction d'ordre 2 et s'écrit de la façon suivante:

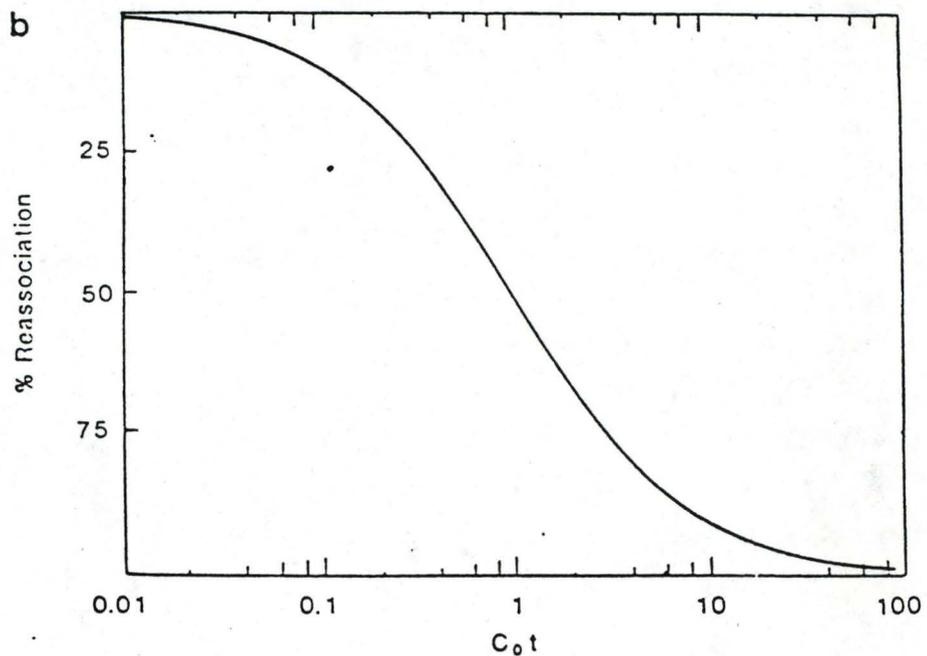
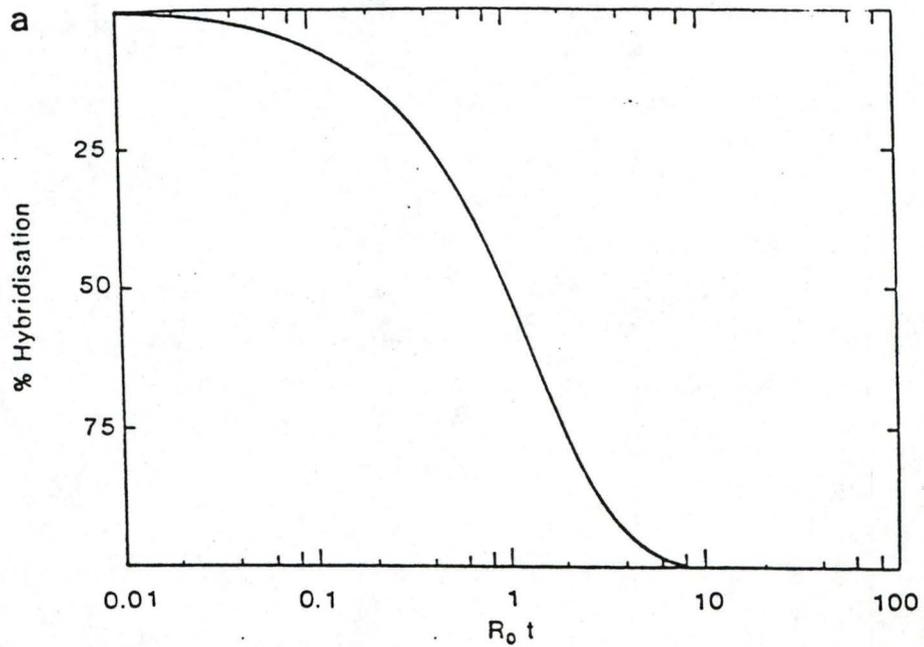


Figure n°I.5a et I.5b : Figures montrant la différence de cinétique de réaction d'ordre 1 (excès d'un des réactifs) et d'ordre 2. Il faut remarquer les différences aux fortes concentrations ou aux temps les plus longs.

$R_0 t$  = concentration initiale d'ARN x le temps

$C_0 t$  = concentration initiale d'ADN x le temps



$$v = \frac{d(H)}{dt} = k (R) (D)$$

au temps zéro  $t_0$ , on a  $R_0$  et  $D_0$

$$\begin{aligned} \text{au temps } t \quad R &= R_0 - H \\ D &= D_0 - H \end{aligned}$$

$$v = \frac{d(H)}{dt} = k (R_0 - H) (D_0 - H) \quad (1)$$

$$\text{En intégrant, on obtient } \frac{1}{D_0 - R_0} \cdot \log \frac{D_0 - H}{R_0 - H} = kt + Q$$

$$\text{Si } t = 0, H = 0 \text{ et } Q = \frac{1}{(D_0 - R_0)} \cdot \log \frac{D_0}{R_0}$$

$$\text{d'où } H = \frac{R_0 D_0 (1 - e^{-(D_0 - R_0) kt})}{R_0 - D_0 e^{-(D_0 - R_0) kt}} \quad (2)$$

## B. Hybridation avec sonde en quantité plus grande que l'ADN cible

$R_0$  est alors en concentration beaucoup plus grande que  $D_0$  (au moins 20 X en excès) et l'équation (1) devient

$$H = D_0 (1 - e^{-k R_0 t}),$$

réaction d'ordre 1 dont la cinétique est montrée à la figure 5a et 6 en échelle semi-logarithmique.

On peut montrer que pour une telle réaction,  $R_0 t_{1/2} = 0,693/k$  donc  $R_0 t_{1/2}$  est directement (inversément) relié à  $k$  la vitesse de réaction.

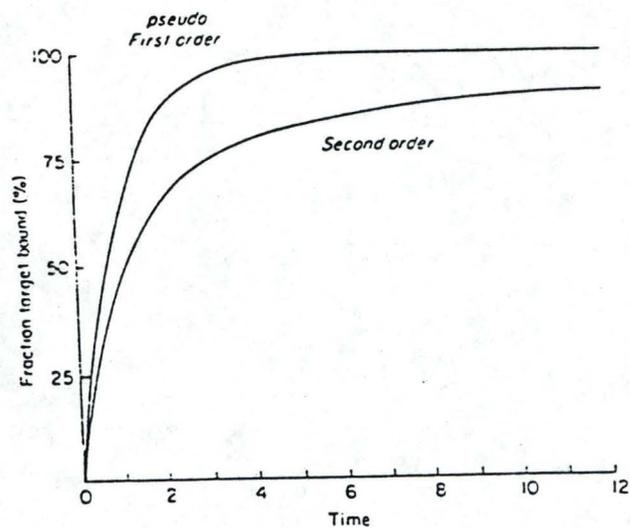


Figure n°6 : Comparaison des vitesses de réactions d'ordre 1(excès d'un des réactifs) et d'ordre 2.

### C. Hybridation avec la sonde en concentration égale à celle de l'ADN

Un exemple concret est la réassociation des doubles chaînes d'ADN lors de la réaction (fig.5b et 6).

Il s'agit d'une vitesse inversement proportionnelle à  $C_0 t$  et non plus exponentielle comme dans le cas précédent. Cela signifie que les hybridations ne doivent pas être de trop longues durées, car des temps longs favorisent la réassociation des brins homologues.

### D. Hybridation avec la sonde en concentration inférieure à celle de l'ADN

Alors  $D_0$  est en concentration beaucoup plus grande que  $R_0$  et l'équation 1 devient:

$$v = \frac{dH}{dt} = k (R_0 - H) (D_0 - H) = k (D_0 - H) \quad (3)$$

$$\frac{dH}{D_0 - H} = k dt$$

### E. Conclusion

La proportion d'hybride va être d'autant plus grande que la constante de dissociation entre deux brins d'ADN ( $k_D$ ) est grande.

Mais en pratique on sait que la constante d'hybridation  $k_H$  est inférieure à  $k_D$  parce que les fragments d'ADN utilisés sont souvent plus petits (comme les sondes) ou bien parce qu'ils sont fixés sur un filtre ou sur le plastique. L'effet de  $k_H < k_D$  a une influence considérable sur le rendement de l'hybridation car il apparaît comme exposant. Par exemple, si  $k_H = 0,1k_D$ , la vitesse de réaction d'hybridation sera 1.000 fois plus lente que la réassociation de l'ADN.

### III.4. FACTEURS INFLUENCANT LA VITESSE DE REACTION

C'est-à-dire facteurs influençant les constantes cinétiques  $k$ .

#### A La composition de la chaîne

La composition de la chaîne (% GC) a peu ou pas d'influence sur la vitesse de réassociation de l'ADN ou de l'ADN-ARN. Elle a, par contre, une influence sur la stabilité de la double chaîne .

#### B La force ionique

A faible concentration la vitesse de réassociation augmente en fonction du cube de la force ionique. Au-delà, la relation est non linéaire.

La présence de sels ( $\text{Na}^+$ ) neutralise les charges négatives des phosphates de l'ADN, ce qui favorise l'association.

#### C La longueur de la chaîne de l'ADN

On observe en pratique que la vitesse de réassociation de l'ADN est proportionnelle à la racine carrée de la longueur de la chaîne. Cette relation est valable pour des longueurs allant de  $10^2$  à  $10^5$  pb.

#### D La viscosité

Des agents tels que le sucrose et le glycerol diminuent la vitesse de réaction. Cependant, des macromolécules comme le dextran sulphate ou le ficoll qui augmentent la viscosité macroscopique, ont aussi un effet d'exclusion de l'ADN et accélèrent la vitesse d'hybridation.

En présence de 2% de dextran sulphate, la vitesse augmente de quatre fois malgré une augmentation de la viscosité de six fois.

#### E Le formamide

A température élevée (60-75°C), l'ADN peut se casser. On peut diminuer la température d'hybridation en utilisant la formamide. Celle-ci déstabilise les doubles hélices. Pour l'ADN, une augmentation de 1% en formamide diminue le  $T_m$  du duplex d'environ 0,72°C. Par contre, la vitesse de réaction diminue de 1,1% par 1% de formamide. Ceci est dû à l'augmentation de viscosité.

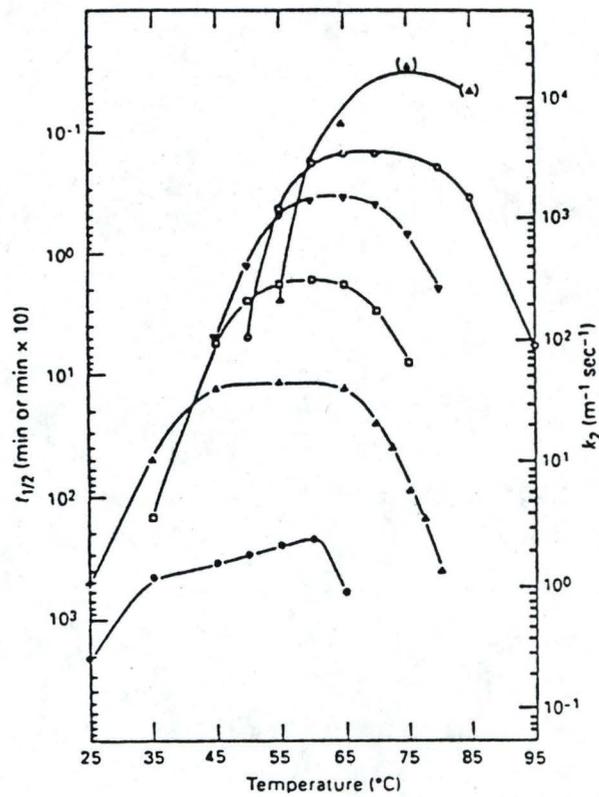


Figure n°I.7 : Effet de la concentration en sel et de la température sur la vitesse d'appariement de l'ADN en solution. Il est intéressant de comparer où la vitesse est maximale avec les  $T_m$ . (J. Remacle 1992).

## F Mismatch

On a vu que le mismatch influençait le  $T_m$  des dimères. En ce qui concerne la vitesse, on estime que si le  $T_m$  diminue de  $15^\circ\text{C}$ , la vitesse de réassociation est diminuée par deux.

## G Température

Il s'agit du facteur le plus important. Aux basses températures, la vitesse de réassociation est nulle ou faible car l'énergie des molécules est trop faible par rapport à l'énergie d'activation de la réaction.

La vitesse va donc augmenter de manière pratiquement exponentielle avec la température. Aux très fortes températures cependant, la formation des ponts hydrogènes ne pourra se faire et donc une diminution de la vitesse sera observée. Entre les deux se trouve un maximum qui est souvent assez large, de  $10$  à  $15^\circ\text{C}$ . Un exemple de relation de la vitesse de réassociation de l'ADN pour diverses concentrations et diverses forces ioniques en fonction de la température est donné à la figure 7.

Il est intéressant d'observer que ces maxima se trouvent beaucoup plus bas que les  $T_m$  indiqués dans la légende. En pratique, la vitesse augmente fortement si on diminue la température à partir du  $T_m$  puis se stabilise à  $T_m-15$  et on obtient le maximum vers  $T_m-25^\circ\text{C}$ . Plus bas la vitesse diminue fortement. C'est donc  $T_m-25^\circ\text{C}$  qui est souvent considéré en pratique.

En ce qui concerne les hybrides ADN-ARN, le maximum est plus proche du  $T_m$  et on utilisera plutôt  $T_m-15^\circ\text{C}$ .

En pratique, on hybride à  $T_m-25^\circ\text{C}$ , puis on augmente progressivement la température jusqu'à ce que l'hybridation spécifique commence à diminuer, à ce moment, on peut être sûr que les fixations d'ADN homologues, non spécifiques ont disparu.

## III.5. ASPECT THEORIQUE DE L'HYBRIDATION SUR SUPPORT SOLIDE

C'est le cas d'un ADN dénaturé (simple brin), adsorbé sur un filtre ou une surface et incubé en présence d'un ADN qui est en solution. On suppose que l'ADN en solution provient d'un double brin et peut se réassocier sur lui-même.

Il s'agit donc de deux réactions compétitives soit ADN-ADN en solution ou ADN-ADN sur le filtre.

Soit  $C_f$  la concentration de l'ADN sur le filtre,  
 $C_s$  la concentration de l'ADN en solution.

$$v = \frac{-d(C_s)}{dt} = k_1 (C_f) (C_s) + k_2 (C_s)^2 \quad (4)$$

$k_1$  = constante de vitesse d'hybridation (=  $k_H$ )

$k_2$  = constante de vitesse de duplex en solution ( $k_D$ )

Ces constantes dépendent de la longueur de l'ADN, elles seront d'autant plus grandes que l'ADN est grand et, proportionnelles à la racine carrée de la longueur de la chaîne. De plus, les vitesses de nucléation sont différentes sur le filtre et en solution.

### Cas où $(C_f) > (C_s)$

C'est-à-dire, beaucoup d'ADN fixé sur le support: Le deuxième terme de l'équation 4 est alors négligeable et on a

$$v = \frac{-d(C_s)}{dt} = k_1 (C_f) (C_s) \quad (5)$$

C'est-à-dire, une réaction d'ordre 1 avec  $(C_f) = ct$ .

Par intégration en fonction du temps ( $t$ )

$$\frac{(C_s)_t}{(C_s)_0} = e^{-k_1 (C_f) t} \quad (6) \quad \text{où } k_1 = \frac{v_{\text{initiale}}}{(C_f)(C_s)}$$

Ceci est vrai en pratique pour de faibles valeurs de  $C_f$  ; à ce moment, la vitesse est proportionnelle à  $C_f$ . En effet, la vitesse est faible et la limitation par diffusion n'intervient pas.

Si  $C_f$  devient important, la vitesse est limitée par la diffusion du réactif sur le filtre et il faut à ce moment tenir compte de ce facteur de diffusion et de la concentration en  $C_s$  qui devient limitante.

$$\text{On a alors } v = J + k_2 (C_s)^2 \quad (7)$$

avec  $J$  = la vitesse de diffusion de  $C_s$  vers le filtre.

## En pratique

1. Si l'on doit fixer sur le filtre le maximum de sonde, le facteur de diffusion  $J$  va devenir limitant par rapport à  $k_2(C_S)^2$  et donc la réassociation en solution sera importante.

Il faut améliorer la diffusion en augmentant la température, en utilisant une sonde en solution pas trop longue, en diminuant le volume de réaction et en agitant. L'idéal est l'utilisation d'une sonde simple brin en solution.

2. Les valeurs de  $k_1$  sont 10 fois plus faibles que celles d'hybridation en solution ( $k_2$ ). Les raisons sont, soit une inaccessibilité de l'ADN fixé sur le filtre, ou des vitesses de nucléation plus lentes.

## Facteurs affectant la liaison sur filtre

Ces facteurs sont essentiellement ceux qui affectent la réaction en solution (cf. ci-dessus).

Examinons ceux qui sont plus spécifiques au filtre.

### 1. La concentration de l'ADN en solution

a) Si l'ADN, en solution est très concentré ( $C_S$ )  $\gg$ , la  $v$  de réassociation en solution sera élevée par rapport à l'hybridation et inversement si  $C_S$  est très faible.

b) On ne peut augmenter fortement l'ADN en solution car on obtient des fixations non spécifiques sur le filtre.

### 2. La longueur de l'ADN

a) En solution, la vitesse de réaction est proportionnelle à la racine carrée du poids moléculaire de l'ADN.

$$v = k\sqrt{L}$$

b) Ceci n'est plus vrai sur le filtre

- Si  $C_f$  est faible par rapport à  $C_S$ , la réaction limitante est la nucléation et la vitesse est indépendante du poids moléculaire.
- Si  $C_f$  est grand par rapport à  $C_S$ , c'est la diffusion vers le filtre qui est limitante et la vitesse d'hybridation est inversement proportionnelle à la longueur de l'ADN en solution.

$$v = k/L$$

En pratique, la vitesse de réaction sur filtre diminue fortement lorsque la longueur de l'ADN en solution augmente, due à la diminution de la vitesse de réaction et à la réassociation.

Il sera donc important si l'on prépare des sondes-biotinylées qu'elle ne soient pas trop longues ( < 400 pb) afin qu'elles ne puissent pas se réassocier. Il vaut mieux par contre avoir sur le support un ADN long.

#### IV. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE REVELATION

Les techniques de dosage de molécules marquées par un isotope radioactif sont précises et sensibles. Leurs désavantages repose évidemment sur les problèmes de stockage des déchets, d'installation de pièces spéciales, de sécurité et de santé liés à l'utilisation des isotopes radioactifs et les contraintes législatives qui en découlent.

Les techniques de sondes froides, par contre, sont sans danger pour l'utilisateur dans la mesure où elles ne font pas appel à des produits cancérogènes et où il n'y a pas d'exposition aux radiations. Elles sont plus simples à mettre en oeuvre et peuvent même être utilisées sur le terrain. La durée de vie de ces sondes est longue (1 an environ) et permet le stockage sans crainte d'une perte d'activité. Parmi les nombreuses applications des sondes froides, en voici quelques unes (Leback- 1987) :

- la détection spécifique de bactéries et de virus
- la détection de maladies génétiques dues à des gènes mutés ou à la mutation d'un seul nucléotide
- l'étude de la résistance aux tumeurs
- la détection en routine de colonies bactériennes ou phages recombinants.

La technique des sondes froides est basée :

- soit sur la détection directe de l'hybride par couplage covalent d'un enzyme à la sonde,
- soit sur la détection indirecte de l'hybride par des systèmes utilisant des molécules intermédiaires capables de reconnaître des motifs fixés sur la sonde nucléique. Ces molécules sont couplées à des enzymes marqueurs. Cette molécule liée à l'enzyme forme un ensemble appelé le conjugué (Leback, 1987).

Les conjugués peuvent être détectés par la conversion d'un substrat en un produit coloré qui est alors mesuré en spectrophotométrie. C'est le cas de la peroxydase ou de la phosphatase alcaline. Ce dosage permet la détection de ligands en quantités importantes, mais il est peu sensible.

La chémoluminescence se base sur l'émission de lumière à partir d'une molécule chimique qui est excitée au cours d'une réaction souvent catalysée par un enzyme. Les systèmes les plus employés sont soit la peroxydase en présence de luminol et de peroxyde d'hydrogène, soit la phosphatase alcaline en présence d'adamantyl 1,2-dioxétane phényl phosphate (L.J. Kricka, 1991). Ces systèmes de dosage sont sensibles, mais la quantification du signal est très difficile car il est très bref.

Un nouveau système de dosage en chémoluminescence, commercialisé par la firme Boehringer Mannheim, se base sur la détection de sondes à ADN marquées à la digoxigénine (Höltke H. *et al*, 1990). Cette molécule est reconnue par un Ac couplé à la phosphatase alcaline qui, réagissant avec un substrat, provoque l'émission d'un photon détectable.

Cette méthode assez sensible présente cependant l'inconvénient de faire intervenir une molécule toxique et d'être difficile à mettre en oeuvre. De plus, l'invention est brevetée et les produits sont assez coûteux.

La bioluminescence a pour principe l'émission naturelle d'un photon provoquée par une réaction enzymatique des luciférases en présence de leurs substrats. Il existe deux types de luciférases, celle utilisant l'ATP comme substrat et celle utilisant l'oxydation du NADH ou du NADPH comme source d'énergie. Ces enzymes permettent la mesure de substrats en quantité très faible ( $10^{-12}$  moles). On comprend dès lors le succès de tels enzymes dans les systèmes de détections. La luciférase à ATP a un rendement quantique 10 fois plus élevé que la luciférase à NAD(P)H, ce qui permet un seuil de détection des substrats 10 fois plus bas. Outre leur grande sensibilité, l'émission de lumière de ces enzymes peut durer jusqu'à trois jours (en présence des substrats). Ceci facilite la lecture qui ne doit pas obligatoirement être faite dans un bref délai après la mise en route de la réaction. Les appareils de lecture ne sont pas non plus ultrasophistiqués et restent abordables aux petits laboratoires.

Cependant, l'utilisation des luciférases comme marqueurs a été limitée par l'inactivation de ces enzymes au contact des supports ou par les agents utilisés pour réaliser le couplage de ces enzymes sur les différents ligands.

**MATERIELS ET METHODES**

## I. TAMPONS - SOLUTIONS STOCKS - MILIEUX

Différentes solutions stocks ont été préparées et utilisées lors de nos expériences, à savoir:

- **Ethyl diamine tétracide (EDTA) 0,5 M** : Porter à pH 8 à l'aide de NaOH. Stériliser par autoclave. Conserver à température ambiante.

- **Bromure d'éthidium** : 10 mg/ml . Conserver à 4°C dans un récipient entouré de papier aluminium.

- **Chloro isoamylique alcool (CIAA)**: Préparer une solution contenant une part d'alcool isoamylique pour 24 parts de chloroforme.

- **Solution antibiotique Ampicilline 2000 X**: Préparer une solution à 100 mg/ml dans de l'eau distillée. Stériliser par passage sur filtre Millipore de 0,22µm. Aliquoter par 500 µl et conserver à -20°C.

- **Milieu LB**: \* liquide:

Ajouter dans 1 l d'eau distillée: - 10 mg de bactotryptone

- 5 g d'extrait de levure

- 10 g de NaCl (pH 7)

Autoclaver et attendre que la solution soit revenue à une température d'environ 50°C avant d'ajouter les antibiotiques: ampicilline: 50 µg/ml ; tétracycline: 10µg/ml.

\* solide:

Préparer du LB liquide comme ci-dessus. Ajouter 15 g de bacto-agar avant d'autoclaver. Après stérilisation, agiter le milieu de manière à bien répartir l'agar liquéfié et laisser refroidir jusqu'à environ 50°C avant d'ajouter des composés thermolabiles au milieu. Couler ensuite la solution dans des boîtes de pétri de format adéquat, en évitant de former des bulles. Laisser sécher les boîtes pendant 2 ou 3 heures sous la hotte à flux laminaire. Entourer les boîtes de parafilm et les conserver, (couvercle vers le bas) à 4°C.

- **Tris EDTA (TE) 1X:** Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8
- **Tris borate EDTA (TBE 1) X:** - Tris HCl 100 mM , EDTA 1 mM, pH 8
  - Acide borique 0,09 M
- **SSC 20 X:** - NaCl 3 M
  - Citrate de sodium 0,3 M
  - Ajuster à pH 7 avec HCl
- **Solution d'alourdisseur / colorant pour gel d'agarose :**
  - bleu de bromophénol 0,25 %
  - EDTA 25 mM
  - glycérol 50 %
  - porter à volume avec de l'eau distillée
- **PBS :** - Tampon phosphate 10 mM pH 7,4
  - NaCl 0,9%
- **HEPES:** 0,59 g/100 ml de solution contenant 1 mg de DTT, 4 mg d'EDTA. Solution tamponnée à pH 7,75.
- **Solution SOC :** - 2 % de lactotryptone
  - 0,5 % d'extrait de levure
  - NaCl 10 mM
  - KCl 2,5 mM
  - MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 10mM
  - MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10mM
  - glucose 20mM

## II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE UTILISEES

### II.1. TRANSFORMATION BACTERIENNE

#### - Principe :

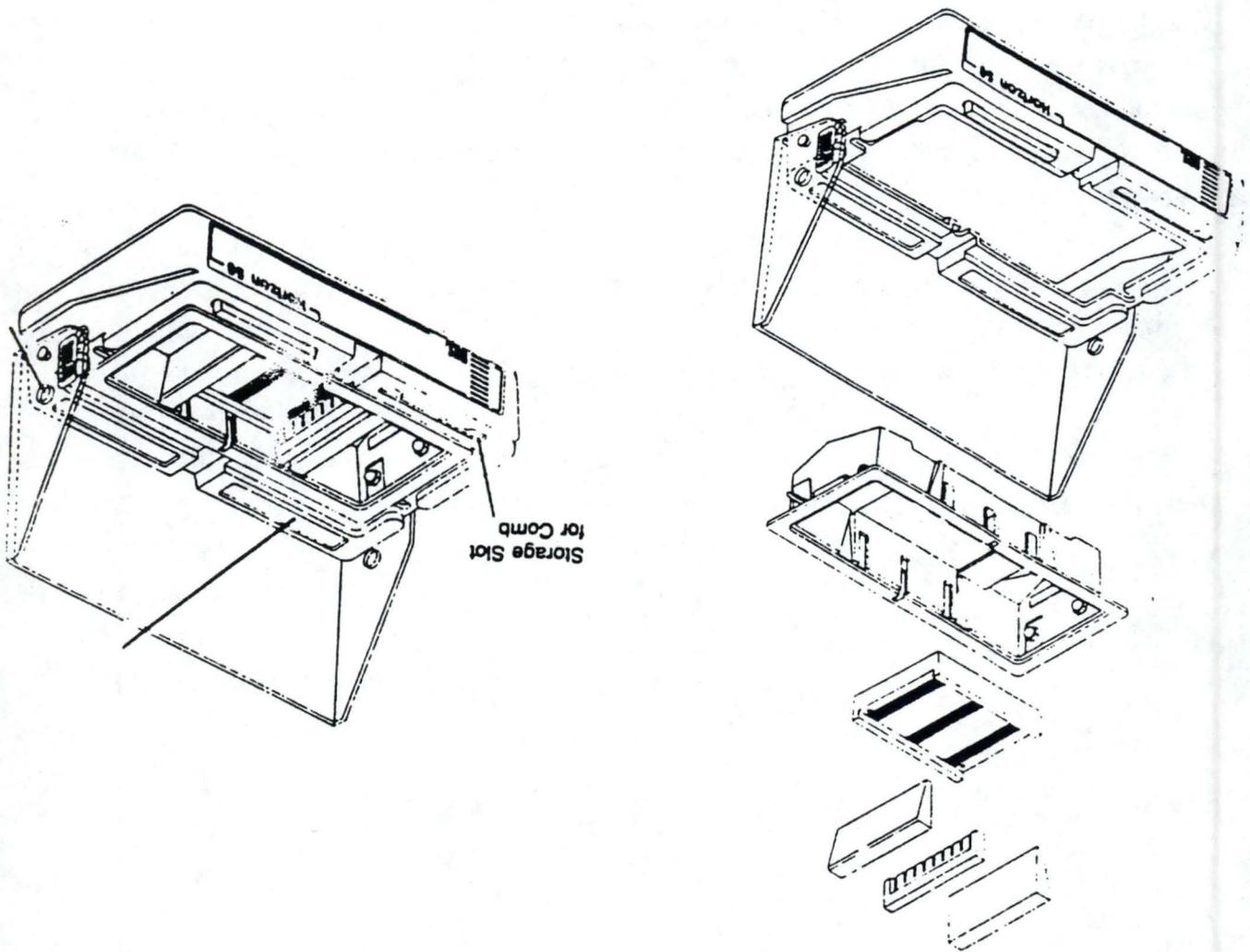
La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un microorganisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent devenir perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. *Escherichia coli*, bactérie Gram<sup>-</sup>, doit être rendue artificiellement compétente par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ou de chlorure de rubidium. Ces ions, déstabilisent la paroi et la membrane de la bactérie qui gonfle, prenant ainsi l'aspect d'un sphéroplaste.

Un choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans la bactérie. Suite à cela, un temps d'incubation d'au moins 30 minutes à 37°C en milieu LB est nécessaire à la bactérie pour régénérer sa paroi et commencer à exprimer l'ADN introduit. Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées, c'est à dire ayant reçu le vecteur (PBR322 dans notre cas) porteur d'un gène de résistance à un antibiotique (l'agent sélectif), pourront croître.

#### - Protocole :

- Placer dans un Eppendorf: 200 à 300 µl de cellules compétentes XL blue et 1 à 500 ng d'ADN plasmidique.
- Incuber 40 minutes sur glace.
- Réaliser un choc thermique 2 minutes à 42°C.
- Ajouter stérilement 1 ml de LB.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Etaler 100 à 200 µl de cellules sur boîtes contenant le milieu sélectif approprié.

- MM1: Schéma représentant l'appareil d'électrophorèse Horizon™ 58 BRL.



## II.2. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

### A. ELECTROPHORESE ANALYTIQUE

La technique d'électrophorèse en gel d'agarose est un moyen classique utilisé pour séparer des fragments d'ADN et évaluer leur taille et leur concentration.

#### - Principe :

A un pH proche de la neutralité, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Ces molécules placées dans un champ électrophorétique migrent donc vers l'anode. Le rapport entre la charge et la masse des molécules étant identique quelque soit la taille des fragments, la séparation des molécules selon leur taille résulte :

- d'une force de migration due au champ électrique (70 à 80 mV)
- d'une force de freinage différentielle exercée par le gel.

La vitesse de migration des molécules d'ADN dans un gel d'agarose dépend entre autres de la conformation de l'ADN, de la concentration en agarose du gel, du voltage appliqué, du type de tampon utilisé et du poids moléculaire de l'ADN.

Les molécules bicaténaires et linéaires d'ADN migrent à une vitesse qui est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.

Pour visualiser l'ADN, on utilise un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases de l'ADN. Une fois associé à l'ADN, il possède une fluorescence accrue, qui peut être mise en évidence par une illumination sous UV à 302 nm.

#### - Protocole :

1. Dissoudre l'agarose (0,8%, 1% ou autre selon la taille des fragments à séparer) dans un volume adéquat de tampon d'électrophorèse (TBE ou TE) par chauffage.
2. Monter l'appareil d'électrophorèse (Horizon<sup>TM</sup> 58 BRL) comme présenté ci-contre ( fig. MM1).
3. Lorsque la température du gel est revenue aux environs de 55°C, ajouter le bromure d'éthidium à concentration finale de 0,3 µg/ml, mélanger et couler le gel sur le support en plexiglas. Placer le peigne et laisser solidifier le gel.

4. Echantillons: Ajouter un sixième de volume de solution d'alourdisseur/colorant permettant de suivre le front de migration et augmentant la densité des échantillons, entraînant ceux-ci au fond des puits.

5. Enlever le peigne du gel de manière à créer les puits, déposer les échantillons dans les puits et recouvrir le tout de tampon d'électrophorèse.

6. Connecter le tout à la source de tension et choisir le voltage désiré. Laisser migrer un laps de temps adéquat, en général 2 heures pour un minigel (de 10 cm de long).

#### Estimation de la taille du fragment:

On fait migrer des fragments d'ADN de taille et de concentration connues dans un puits voisin de ceux des échantillons. Le marqueur le plus utilisé est le phage  $\lambda$  digéré par HindIII, permettant l'estimation des fragments de taille de 0,6 à 8 Kb. Grâce aux marqueurs de taille, on peut tracer une courbe d'étalonnage donnant le logarithme du PM en fonction de la distance de migration. A partir de cette courbe, et en connaissant la distance de migration des échantillons, on peut estimer leur taille.

## B. ELECTROPHORESE PREPARATIVE

Cette technique permet de récupérer un fragment intéressant à partir d'un gel d'agarose. Deux méthodes sont couramment utilisées:

- la méthode Geneclean utilisant le kit commercialisé par la firme Geneclean (Bio 101 Inc)
- la méthode utilisant les membranes DEAE, méthode que nous avons suivie et qui est explicitée ci-dessous.

#### - Principe :

Les fragments d'ADN sont séparés sur gel. Le gel est alors coupé en avant du fragment intéressant de manière à pouvoir insérer une membrane de DEAE-cellulose dans l'encoche. L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que l'ADN se soit fixé sur la membrane. La membrane est ensuite récupérée et lavée dans un milieu de force ionique élevé pour éluer l'ADN.

## - Protocole :

### - Préparation des membranes DEAE :

Couper les membranes aux dimensions adéquates. Placer la membrane dans une solution d'EDTA 10mM PH 8 pendant 5 minutes. La placer ensuite 5 minutes dans du NaOH 0,5N et la rincer 6 fois dans de l'eau stérile. Conserver les membranes dans une solution d'EDTA 10 mM à 4°C et rincer dans le tampon d'électrophorèse avant emploi.

### - Récupération des fragments :

1. Faire migrer l'ADN sur un gel d'agarose 1% / TBE 1X.
2. Repérer l'insert aux U.V. et placer la membrane de DEAE devant l'insert.
3. Remettre migrer pendant 10 minutes. Vérifier aux U.V. que l'insert est bien sur la membrane.
4. Mettre la membrane dans un tube eppendorf avec 200 µl de NaCl 1M, incubé pendant 30 minutes à 65°C.
5. Récupérer le liquide et recommencer une seconde fois avec 200 µl de NaCl.
6. Faire un phénol chloroforme pour purifier l'insert.

## II.3. MESURE DE LA CONCENTRATION EN ADN

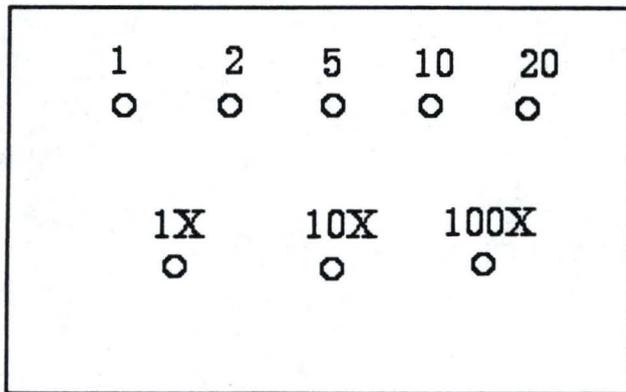
### - De manière approximative

- Comparaison de la fluorescence de l'échantillon à celle du marqueur.

La fluorescence émise par une bande est proportionnelle au nombre de molécules de bromure d'éthidium intercalées dans l'ADN, et donc à la longueur et à la concentration de ce fragment d'ADN. On peut ainsi estimer la concentration de l'échantillon en comparant sa fluorescence à celle des bandes du marqueur lambda de concentration connue.

- Comparaison de la fluorescence de l'échantillon à celle d'un étalonnage.

Sur une plaque de verre recouverte d'un film plastique, déposer des gouttes de 2 µl d'éthidium bromide pour chaque dilution de l'ADN étalon (ADN de phage λ) et de l'ADN à mesurer. Sur les gouttes d'éthidium bromide destinées



→ ADN de lambda à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )

→ ADN de l'échantillon à différentes dilutions.

- MM2 : Comparaison de la fluorescence de l'échantillon à celle d'un étalonnage. Les différentes gouttes contiennent  $2\mu\text{l}$  d'éthidium bromide (  $10 / \text{ml}$  ) et  $2\mu\text{l}$  d'ADN à des concentrations connues (étalon) ou non (échantillon).

à l'étalonnage, ajouter 2 $\mu$ l des différentes dilutions de l'étalon. Sur celles destinées à la mesure de l'échantillon, ajouter 2 $\mu$ l des différentes dilutions de l'échantillon (fig.MM2).

Exposer le film plastique aux U.V. et comparer l'intensité des gouttes d'ADN de concentration inconnue à celle de l'étalon.

Remarque: Cette méthode requiert des solutions d'ADN préalablement purifiées de tout ce qui pourrait fausser l'estimation ou la rendre imprécise.

#### **- De manière empirique**

- En spectrophotométrie : On peut mesurer la densité optique à 260 nm pour évaluer la concentration. 1 DO = 50  $\mu$ g/ml. Cette technique nécessite donc au moins 0,2 ml de solution à mettre dans la cuvette. Nous ne travaillons pas avec des quantités aussi grandes d'ADN, ce qui rend cette technique inapplicable dans notre cas.

## II.4. DIGESTIONS ENZYMATIQUES

### **- Principe :**

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent et clivent des séquences spécifiques (en général de 4 ou 6 pb) au niveau de l'ADN bicaténaire. Les fragments générés possèdent une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' hydroxyle.

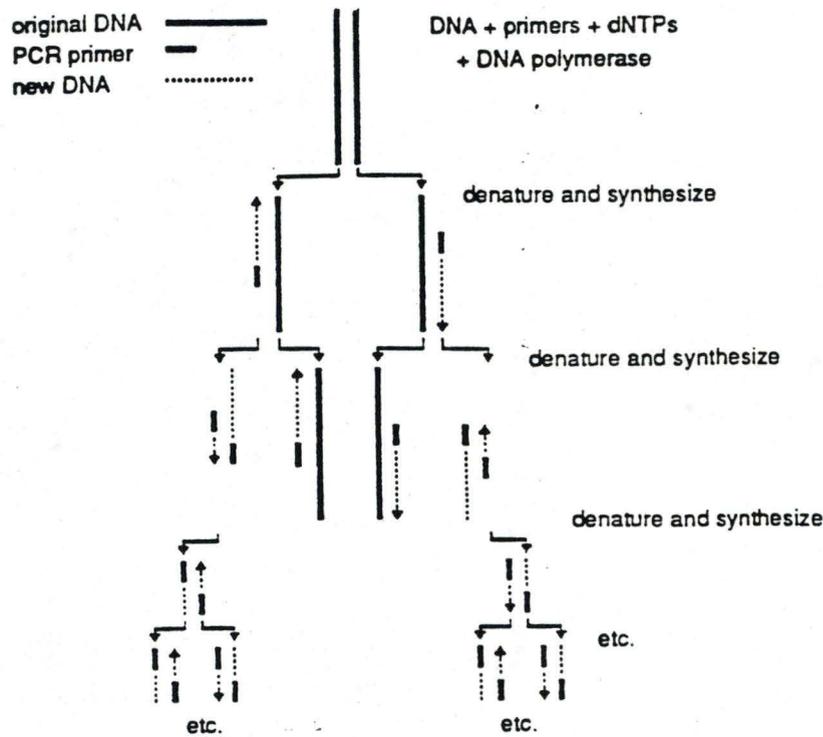
D'un point de vue pratique, on peut classer ces enzymes en deux groupes: - ceux hydrolysant les liens phosphodiesters de manière à produire des bouts francs (blunt ends).

- ceux hydrolysant les liens phosphodiesters de manière à produire des extrémités cohésives, soit 3' protrudantes soit 5' protrudantes.

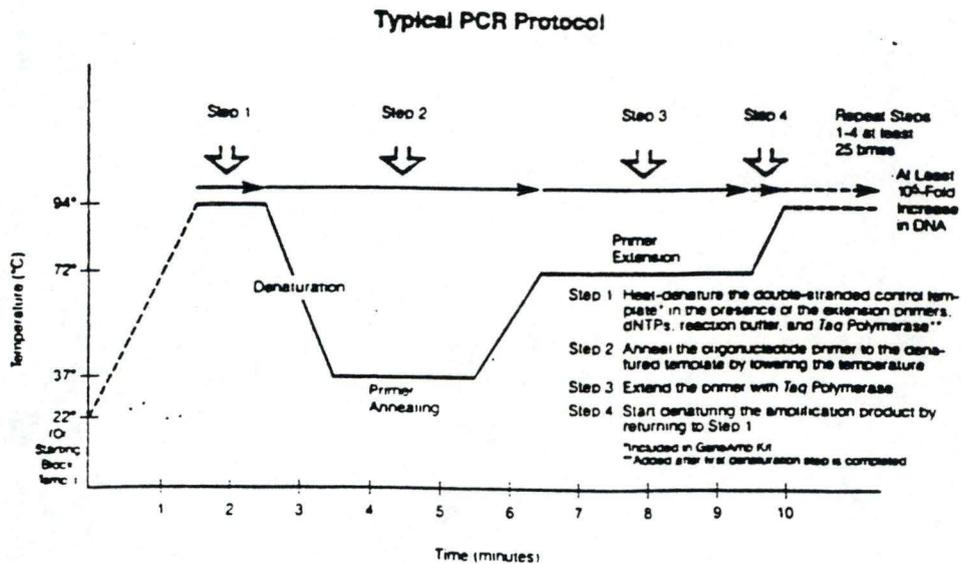
### **- Protocole :**

Les enzymes sont utilisés dans des conditions de température et de tampon optimales.

1. Placer l'ADN à digérer dans un eppendorf stérile.



- MM3 : Principe de la PCR: l'ADN à amplifier est dénaturé à 95°C. Deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence situées aux extrémités 3'-OH de l'ADN cible, sont mis à hybrider avec ce fragment d'ADN. Les extrémités 3'-OH des oligonucléotides servent d'amorce pour une ADN polymérase. Chaque brin sert alors de matrice pour l'enzyme qui synthétise un brin complémentaire. Les produits de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur, et les primers sont remis à hybrider avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification recommençant ainsi un nouveau cycle. Et ainsi de suite jusqu'à ce que l'ensemble des cycles soient terminés.



- MM4 : Principe de la PCR: Représentation donnant les conditions de température au cours d'un cycle .

2. Ajouter 2  $\mu$ l de tampon de digestion adéquat.
3. Ajouter une unité d'enzyme par  $\mu$ g d'ADN à digérer.
4. Porter à un volume de 20  $\mu$ l avec de l'eau stérile.
5. Incuber 1 heure à température adéquate.
6. Arrêter la réaction en ajoutant de l'EDTA à concentration finale de 10mM.

## II.5...TECHNIQUE DE PCR

### A. PRINCIPE

L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR: polymerase chain reaction) est une technique rapide permettant, in vitro, l'amplification par voie enzymatique, d'un fragment d'ADN donné, que cet ADN cible soit sous forme purifiée ou dans un mélange complexe.

La technique de PCR est assez simple d'un point de vue technique. Elle nécessite :

- la présence, purifiée ou dans un mélange complexe, de la séquence cible à amplifier, sous forme bicaténaire.
- deux oligonuléotides capables de s'hybrider chacun à l'un des deux brins de l'ADN matrice déterminant ainsi la séquence à amplifier.
- une ADN polymérase de préférence thermostable telle que la Taq polymérase.
- des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).
- un tampon adéquat contenant des ions  $Mg^{++}$ .

Cette technique met en jeu la répétition (souvent de 20 à 50 fois) d'un cycle de trois étapes (fig.MM3 et MM4).

Ces étapes sont:

- la dénaturation de l'ADN matrice par chauffage à 95°C.
- "l'annealing": au cours de cette étape, chaque primer s'hybride au brin complémentaire de la séquence matrice.

Inhibitor Effects on *Taq* Pol I Activity

<u>Inhibitor</u>	<u>Concentration</u>	<u>Activity*</u>
Ethanol	≤3%	100%
	10%	110%
Urea	≤0.5 M	100%
	1.0 M	118%
	1.5 M	107%
	2.0 M	82%
DMSO	≤1%	100%
	10%	53%
	20%	11%
DMF	≤ 5%	100%
	10%	82%
	20%	17%
Formamide	≤10%	100%
	15%	86%
	20%	39%
SDS	.001%	105%
	.01%	10%
	.1%	<.1%

\*dNTP incorp. activity at 70° with Salmon Sperm DNA/10 min

- MM5 : Agents affectant l'activité de la *Taq* ADN polymérase.

- l'extension: l'ADN polymérase va, à partir de l'extrémité 3' libre de chaque primer, synthétiser un nouveau brin complémentaire de la matrice.

La quantité de matériel produit double au cours de chaque cycle, conduisant à une accumulation exponentielle de la séquence cible.

## B. MISE EN OEUVRE D'UNE PCR

### - L'ADN polymérase

L'introduction d'une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase, isolée à partir de la souche bactérienne thermophile *thermus aquaticus* a grandement facilité la technique PCR, permettant le développement de cycleurs automatiques. Cet enzyme possède un optimum de température se situant aux environ de 72°C, ce qui nous a permis de réaliser les étapes d'hybridation et d'élongation à des températures plus élevées, augmentant ainsi la spécificité des réactions et résolvant les problèmes de structure secondaire. De plus, le rendement est supérieur à celui de la Klenow, utilisée pour les premières PCR, et les fragments amplifiés peuvent être de taille plus importante (jusqu'à 10 Kb).

L'enzyme nécessite la présence d'ions magnésium dans le milieu, il est inhibé par des concentrations trop élevées en DMSO (10%). L'urée et l'éthanol semblent avoir un effet activateur (fig.MM5).

La fidélité de l'enzyme a largement été étudiée, celle-ci ne possédant pas d'activité proof reading 3'-5' exonucléase. Les derniers résultats donnent un taux de mutation moyen de  $5 \times 10^{-6}$  nucléotides mal incorporés par cycle (environ une mutation pour 15 000 nucléotides, en considérant 30 cycles). Ce taux d'erreur ne pose cependant aucun problème pour la plupart des applications.

Lors de la réaction d'amplification de séquences complexes, telles que celle d'ADN génomique, la concentration en enzyme est en général de 2,5U/100 µl de solution réactionnelle. Augmenter la concentration au delà de cette valeur conduirait non pas à une augmentation du rendement, mais à une accumulation plus importante de produits non spécifiques.

## - Choix des primers

Ce sont les primers, plus que tout autre élément, qui déterminent le succès ou l'échec d'une PCR. Les primers typiques ont de 15 à 30 nucléotides de longueur, et une composition de 50 à 60 % en G+C. Quelques règles peuvent cependant être observées lors du choix d'un primer :

- éviter les séquences contenant des régions de polypurines ou pyrimidines.
- éviter les séquences donnant lieu à des structures secondaires, surtout à l'extrémité 3' du primer.
- vérifier que les deux primers choisis ne soient pas complémentaires l'un de l'autre au niveau de leur extrémité 3'. Ceci conduirait à la synthèse d'artéfacts appelés "dimères de primers", diminuant gravement le rendement de la PCR.

La température d'hybridation d'un couple de primers donnés est à adapter en fonction de la composition en bases. On peut prendre comme point de départ la règle suivante: additionner 2°C par base A ou T et 4°C par base G ou C.

En général, les concentrations en primers utilisées varient de 0,05  $\mu\text{M}$  à 1 $\mu\text{M}$ .

## - Le tampon de PCR

La concentration en magnésium a un effet important sur la spécificité et le rendement de la réaction . Des concentrations de 1,5 mM sont en général adéquates pour une concentration en dNTPs de 200  $\mu\text{M}$ . Un excès de magnésium conduit à une accumulation de produits non spécifiques, alors qu'une concentration trop faible diminue le rendement de la réaction.

Il faut éviter d'utiliser une concentration en dNTPs supérieure à 200  $\mu\text{M}$ . Cette concentration est suffisante pour synthétiser 12,5  $\mu\text{g}$  d'ADN avec incorporation de 50 % des dNTPs. Une concentration trop importante risquerait d'augmenter le taux d'erreur de l'enzyme. De plus, les dNTPs captent les ions magnésium, diminuant ainsi la quantité de  $\text{Mg}^{2+}$  réellement disponible pour l'enzyme.

Les 4 dNTPs doivent être utilisés à concentration égale pour éviter les erreurs d'incorporation. De plus, il semble que les concentrations faibles en dNTPs diminuent le risque de mismatch entre le primer et la séquence cible ainsi que le risque d'élongation à partir d'un nucléotide mal incorporé.

## - Les conditions de cycle

La PCR est réalisée en soumettant les échantillons à 3 températures successives différentes correspondant aux 3 étapes du cycle: dénaturation, annealing et extension. Les réactions sont réalisées dans un cycleur automatique (Techne PHC3).

### 1. Dénaturation.

Il est très important qu'une séparation complète des deux brins soit réalisée au cours de cette étape. Pour cela, une incubation d'une minute à 95°C est suffisante. On peut également commencer la réaction de PCR par une incubation de 5 à 10 minutes à 95°C pour s'assurer que tout le matériel est parfaitement dénaturé pour l'étape d'hybridation des primers.

### 2. Annealing.

Il est important que les primers s'hybrident de manière stable à la matrice. La température d'annealing doit donc être déterminée en fonction de la composition en bases des primers. En général, 55°C est une bonne température pour un primer de 20 bases, avec 50 % de G+C.

Des températures plus basses peuvent être nécessaires, avec alors le risque de voir s'accumuler des produits non spécifiques.

Les primers étant ajoutés en très large excès, l'hybridation se fait de manière quasi instantanée. Ceci veut dire qu'un temps de 30 à 60 secondes est largement suffisant pour l'étape d'annealing.

### 3. L'extension

L'extension se fait à une température de 72°C, proche de l'optimum de température de la Taq ADN polymérase.

Le temps d'extension dépend principalement de la longueur de la séquence cible. On compte en général une minute pour 2000 pb, ce laps de temps étant largement suffisant.

Pour des séquences très longues, on peut augmenter le temps d'élongation jusqu'à 15 minutes. Au cours des derniers cycles de PCR, la quantité de Taq ADN polymérase peut devenir limitante. Il est donc conseillé de terminer une réaction de PCR par une incubation de 10 minutes à 72°C de manière à assurer la terminaison de toutes les séquences commencées.

#### - Le nombre de cycles

Le nombre de cycles dépend de la concentration initiale de la séquence à amplifier. Il faut remarquer qu'un nombre de cycles trop important ne peut conduire qu'à une amplification supplémentaire de produits non spécifiques. En fonction de la quantité de séquences cibles, on pourra appliquer les nombres de cycles suivants:

3 x 10 <sup>6</sup> molécules cibles	25 à 30 cycles.
1,5 x 10 <sup>4</sup>	30 à 35 cycles.
1 x 10 <sup>3</sup>	35 à 40 cycles.
50	40 à 45 cycles.

A titre d'indication, 1µg d'ADN génomique contient environ 3 x 10<sup>5</sup> molécules d'une séquence cible unique.

#### - Facteurs affectant la spécificité

Des températures d'annealing et d'extension élevées, ainsi que des concentrations plus faibles en dNTPs, semblent diminuer le nombre de primers mal appariés ainsi que l'extension de ces mismatches.

On peut aussi réduire les temps d'annealing et d'extension, limitant ainsi la formation de mismatch et leur extension.

La réduction des concentrations de primers et d'enzyme limite également le risque de formation de produits non spécifiques.

### C. PROTOCOLE STANDARD D'UNE PCR

Il n'existe malheureusement pas de protocole unique pouvant être appliqué pour toutes les réactions PCR. On peut cependant donner un schéma de départ, qui pourra être adapté en fonction des caractéristiques de la séquence à amplifier (concentration, longueur, complexité,...).

Remarques préliminaires : étant donné l'énorme capacité d'amplification de cette technique, toutes les mesures doivent être prises pour éviter les contaminations. Pour cela, il faut travailler dans un local isolé, différent des endroits où l'on manipule habituellement de l'ADN, et réserver du matériel uniquement pour les réactions de PCR.

#### - Matériel

La Taq ADN polymérase (Promega, Pays-Bas) est fournie dans un tampon contenant des agents stabilisants pour les hautes températures (solution stock: 50% glycérol, 50 mM Tris HCl PH 8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 200 µg/ml gélatine, 1% triton X-100). La firme fournit également le tampon 10 X (50 mM KCl, 100mM Tris HCl PH 9, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% gelatine, 1%triton X-100). les dNTPs (Boehringer) sont dilués à une concentration stock de 10mM. L'ADN matrice est celui de PCHL2 (plasmide de *Chlamydia trachomatis* serovar L2. inséré dans PBR322).

#### - Protocole

1. Dans un éppendorf de 1,5 ml, préparer la solution suivante (pour 100 µl de solution réactionnelle) :

- 10 µl de tampon 10 X
- 200 µM de chaque dNTP
- 100 pM de chaque primer dilué à concentration adéquate dans de l'eau distillée
- 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> molécules d'ADN matrice (par exemple 1 µg d'ADN génomique si la séquence à amplifier correspond à un gène unique)
- 2,5 U de Taq ADN polymérase diluée dans de l'eau distillée stérile

2. Ajouter dans chaque tube quelques gouttes d'huile minérale, afin d'éviter l'évaporation de la solution de réaction.

3. Placer une goutte d'huile dans les puits du cycleur automatique pour assurer un meilleur échange thermique. Placer ensuite les eppendorfs dans les puits.

4. Programmer 30 cycles de réaction d'après le profil suivant :

- dénaturation : 4 min à 95°C	1X
- dénaturation : 1 min à 95°C	30 X
- annealing : 1 min à 55°C	30 X
- extension : 2 min à 72°C	30 X
- extension : 10 min à 72°C	1 X

5. Après réaction, conserver les échantillons à 4°C jusqu'à analyse.

6. Pour vérifier les résultats de la PCR, déposer un dixième de la réaction sur gel d'agarose 1 %, avec le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$  coupé par HindIII.

### III. PHOSPHORYLATION, MARQUAGE ET BIOTILYLATION D'ADN

#### III.1. PHOSPHORYLATION DE L'EXTREMITÉ 5' D'UN FRAGMENT D'ADN

##### - La réaction :

La réaction se réalise dans le tampon de composition suivante dilué 5X:

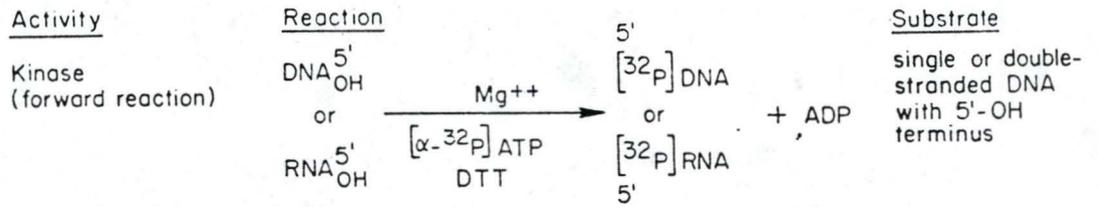
- Tris HCl 250 mM PH 7,5 (Merck 8382)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Merck 5833)
- DTT 25 mM (Sigma D-0632)
- BSA 250 µg/ml (Sigma B-2518)

Ce tampon peut être aliquoté et conservé à -20°C.

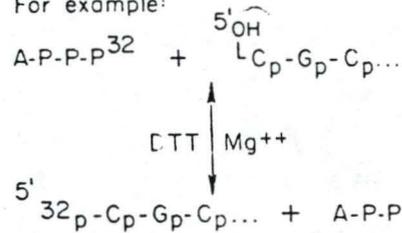
## T4 Polynucleotide Kinase

(T4 -infected E.coli)

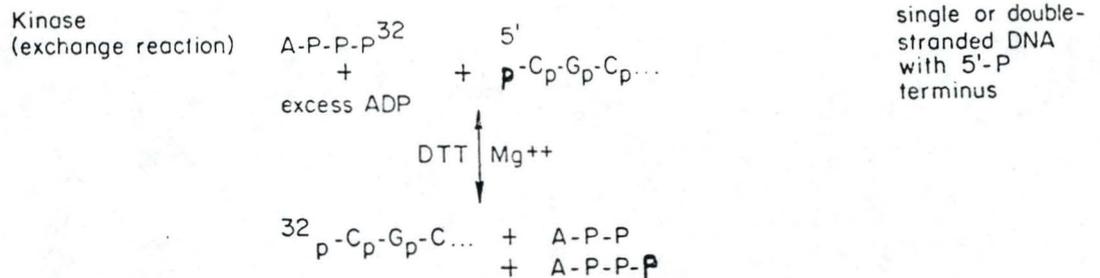
The enzyme catalyzes the transfer of the  $\delta$ -phosphate of ATP to a 5'-OH terminus in DNA or RNA (Richardson 1971).



For example:



- MM6 : Réaction de phosphorylation de l'extrémité 5'-OH d'ADN avec un phosphate radioactif catalysée par la T4 polynucléotide kinase



The excess ADP drives the exchange reaction, causing polynucleotide kinase to transfer the terminal 5'-phosphate from DNA to ADP. The DNA is then rephosphorylated by transfer of the labeled  $\gamma$ -phosphate in the  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Berkner and Folk 1977).

- MM7 : Réaction d'échange de phosphate entre l'ATP- $\gamma$   $^{32}$  et le phosphate en position 5' de l'ADN catalysée par la T4 polynucléotide kinase

**- Protocole pour une phosphorylation avec un phosphate froid :**

Pour un volume de réaction de 100  $\mu$ l, mettre dans un eppendorf stérile:

- 20  $\mu$ l de tampon (il faut respecter une proportion 1 pour 5 entre le volume de tampon et le volume total)
- 30 pm d'ADN
- 40 U de T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim n°174645)
- 6  $\mu$ l d'ATP 16,6 mM (Sigma A-5384)
- mettre à volume avec de l'eau stérile

Laisser incuber 1 heure à 37°C, arrêter ensuite la réaction avec 2  $\mu$ l d'EDTA 0,5M.

**- Protocole pour une phosphorylation avec un phosphate radioactif :**

Le protocole est mis à part l'ATP froid qui est remplacé par l'ATP radioactif (ATP- $\gamma$  32 Amersham PB 10168) à raison de 60  $\mu$ Ci pour un volume de réaction de 100  $\mu$ l (fig. MM6).

### III.2. MARQUAGE RADIOACTIF D'ADN PHOSPHORYLE EN 5'

**- Principe :**

Il s'agit ici non plus d'ajouter un phosphate à l'extrémité 5' phosphate de l'ADN, mais de procéder à une réaction d'échange de phosphate entre l'ATP-g 32 et le phosphate de l'extrémité 5' de l'ADN (fig. MM 7).

**- Protocole :**

Le protocole est le même que celui de la phosphorylation, mis à part le tampon qui est adapté à cette réaction d'échange de phosphate.

Le tampon est composé de :

- Imidazole chloride 250 mM PH 6,6 (Merck 4716)
- Mg Cl<sub>2</sub> 50 mM (Merck 5833)
- DTT 25 mM (Sigma D-0632)
- ADP 25 mM (Sigma A-4386)
- BSA 250 µg/ml (Sigma B-2518)

Ce tampon peut être aliquoté et conservé à -20°C.

### III.3. BIOTINYLATION D'ADN A L'EXTREMITE 3'

#### - Principe :

Il existe plusieurs méthodes de marquage d'ADN à la biotine (par nick-translation, par la photobiotine), mais la méthode retenue est celle par l'enzyme terminal déoxynucléotidyl transférase.

Cet enzyme incorpore les dNTPs biotinylés ou non en 3' du fragment d'ADN. Il se forme une queue de nucléotides dont certains sont biotinylés. La longueur de cette queue marquée est directement proportionnelle à la durée de la réaction. En général, après une heure à 37°C, une queue d'environ 7 nucléotides s'est formée (Karger, 1989).

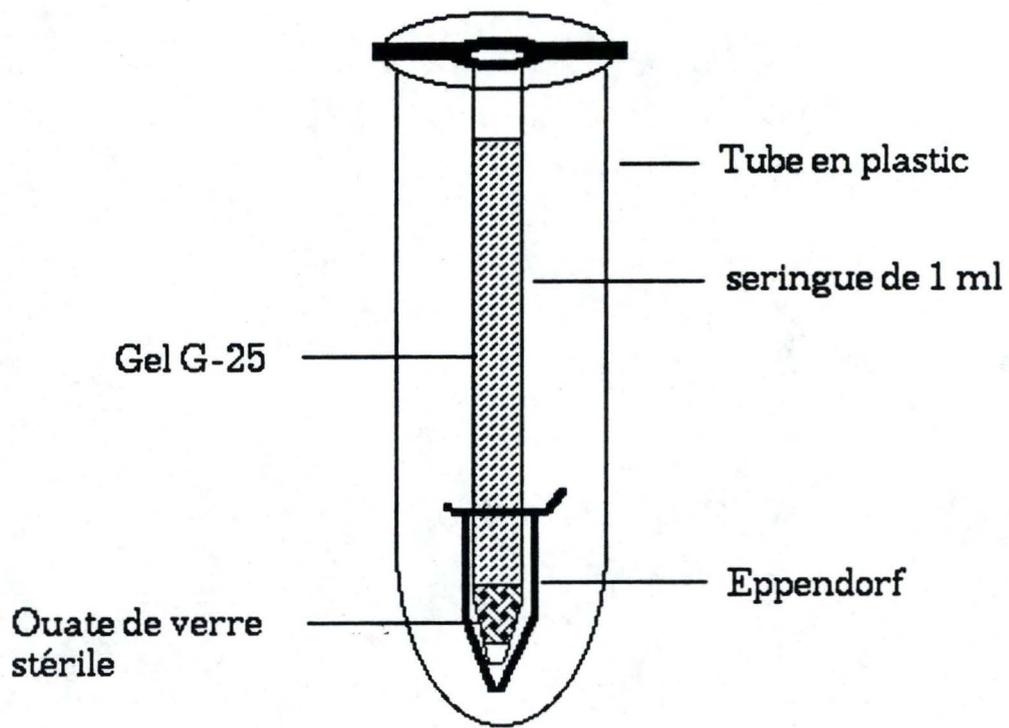
#### - Protocole :

Pour un volume réactionnel de 50 µl, mettre dans un eppendorf stérile :

- 1 nm de dUTP-16- Biotine (Boeringer Mannheim )
- 0,5 nm de dCTP (Boehringer Mannheim cat. n°104 035)
- 20 U de terminal déoxynucléotidyl transférase (Gibco BRL n°can101)
- 0,2 nm d'ADN
- 10 µl de tampon tailing 5 X (fourni avec le d UTP-16-biotine)

Incuber 1 heure à 37°C

Stopper la réaction avec 5 µl d'EDTA 100 mM PH 8



- MM8 : Spin colonne utilisée pour purifier des solutions d'ADN après PCR ou phosphorylation.

#### IV. PURIFICATION D'ADN SUR SPIN COLONNE

Cette technique est très couramment utilisée pour de nombreuses applications telles que :

- purifier le produit d'une PCR: séparer le fragment amplifié des dNTPs, des primers en excès, de l'huile et autres molécules contenues dans le tampon de PCR. Ceci est indispensable pour une mesure correcte de la concentration en ADN amplifié.
- purifier le produit d'une réaction de phosphorylation d'ADN: séparer le fragment phosphorylé des nucléotides non incorporés et autres molécules contenues dans le tampon de phosphorylation, et ce, qu'il s'agisse d'une phosphorylation "froide" ou radioactive ( $\gamma$  P<sup>32</sup>).

#### **- Principe :**

Le principe est le même que pour une purification sur tamis moléculaire et donc basé sur une séparation selon le poids moléculaire (PM). Les molécules de PM supérieur à la porosité du gel, passant dans le volume mort de la colonne, s'éluent en premier lieu, alors que les molécules de faible PM, passant dans le volume total de la colonne s'éluent ensuite.

#### **- Protocole :**

Dans une seringue de 1ml, bouchée préalablement par une peu d'ouate de verre stérile, couler un gel de G 25 (Pharmacia LKB - Uppsala) équilibré dans du TE à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Placer la seringue dans un tube en plastique calibré pour la centrifugeuse.

Centrifuger une première fois 1 min. à 2400 rpm pour tasser le gel, puis une seconde fois après avoir recoulé du gel jusqu'à remplir la seringue.

Jeter l'eau coulée au fond du tube en plastique et y placer un eppendorf (fig.MM8).

Déposer  $\pm$  50  $\mu$ l bien au milieu de la seringue et centrifuger dans les mêmes conditions. Recentrifuger un certain nombre de fois selon le cas en déposant 50  $\mu$ l d'eau ou de TE sur le gel.

Le nombre de s dépend du PM du fragment à purifier et du gel utilisé, le

nombre de centrifugations optimum étant un compromis entre la récupération maximum du fragment désiré et minimum des molécules contaminantes de PM inférieur.

#### **V. FIXATION COVALENTE D'ADN SIMPLE BRIN SUR PLAQUE DE POLYSTYRENE**

Le protocole initialement utilisé est tiré d'une publication de la société danoise A/S Nunc (Rasmussen *et al*, 1991).

- L'ADN à fixer sur plastic est dissout dans de l'eau stérile à une concentration de 7,5ng/ml et dénaturé à 100°C pendant 10 minutes, après quoi il est directement refroidi dans la glace afin d'éviter le réappariement des brins complémentaires. Cet ADN doit obligatoirement être phosphorylé en 5' si on veut qu'il se fixe covalamment au plastic.

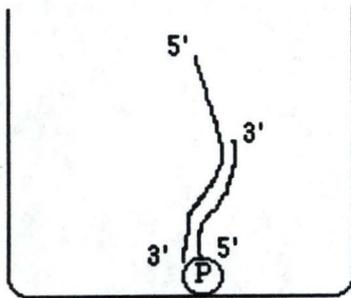
- Ajouter du tampon MeIM pH7 pour avoir une concentration finale en MeIM de 10mM. La solution est ensuite répartie dans les puits des plaques multipuits en polystyrène Covalink (Nunc, Danemark) à raison de 75µl par puits.

- Préparer extemporanément une solution d'agent couplant à savoir l'EDC (1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide) à une concentration de 0,2M dans du MeIM 10mM pH7. Ajouter 25µl de cette solution à chaque puits. La concentration finale en EDC par puits est donc de 0,05M.

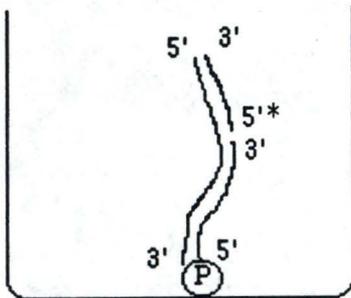
- Incuber la plaque Covalink 5 heures à 50°C.

- Laver 3 fois les puits avec 200 µl de NaOH 0,4N SDS 0,25% à 50°C.

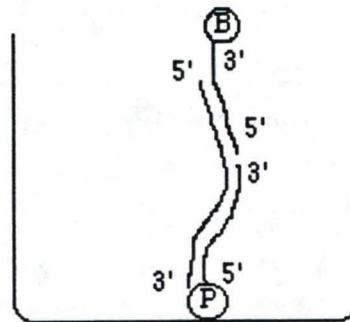
Ce protocole est optimisé dans la suite de ce travail. Les différentes étapes de l'optimisation sont répertoriées dans le chapitre "résultats et discussion".



- MM9 : Hybridation simple : hybridation entre un fragment d'ADN cible simple brin et un fragment, plus court, dit le trappeur, et fixé au fond des puits Covalink.



a



b

- MM10 : Hybridation sandwich : un fragment d'ADN immobilisé sur le support sert de trappeur pour collecter le fragment cible qui est alors détecté par une sonde marquée.
  - a) sonde marquée radioactivement à son extrémité 5'
  - b) sonde marquée à la biotine à son extrémité 3'

## VI. HYBRIDATION ADN-ADN SUR PLASTIC

Toutes les méthodes d'hybridation font appel à la capacité de l'ADN (ou ARN) dénaturé de se réassocier à une séquence complémentaire lorsque les conditions de température sont telles que l'on se trouve en dessous de la valeur de  $T_m$  ( $T_m$  est la température à laquelle 50 % des duplexes sont dissociés sous forme monocaténaire).

Les réactions d'hybridation peuvent se réaliser en solution ou sur support solide (membrane de nylon, nitrocellulose). Les expériences sont, ici, réalisées sur un support solide: les plaques multi-puits en polystyrène Covalink fournies par la société danoise A/S Nunc.

Les protocoles d'hybridation ci-dessous, sont ceux initialement utilisés. Au cours de ce mémoire, nous les avons mis au point et déterminé les conditions optimales d'hybridation propre à notre cas.

### VI.1. HYBRIDATION SIMPLE

#### **- Principe :**

Cette étape consiste en l'hybridation entre un fragment d'ADN cible simple brin et un fragment d'ADN (simple brin également) plus court, dit le trappeur, et fixé au fond des puits Covalink (fig.MM9).

#### **- Protocole :**

Il faut d'abord procéder à la dénaturation du fragment d'ADN fixé au fond des puits avec 200  $\mu$ l/puits de NaOH 0,2 N SDS 0,25% pendant deux à trois minutes. Ceci afin de le rendre simple brin et bien linéaire (condition nécessaire à l'hybridation).

Rincer et mettre ensuite 200  $\mu$ l/puits de solution d'hybridation sans ADN cible. Ceci afin de remettre le milieu à pH 7.

La solution d'hybridation est comparée aux concentrations finales des différents produits suivants :

- solution de Denhart 5X (Sigma D-9905)
- SSC 5X pH 7
- ADN de sperme de saumon 100  $\mu$ g/ml (Sigma D 1626 type 3)
- eau pour avoir un volume final de 200  $\mu$ l/puits

Laisser 5 min. et puis jeter.

Remettre, dans chaque puits, 200  $\mu$ l de solution d'hybridation suivis de l'ajout de 10  $\mu$ l/puits d'une solution contenant l'ADN cible dénaturé (par chauffage pendant 10 min. à 100°C).

Remarque : Il est nécessaire de procéder aussi à des tests négatifs avec de l'ADN cible non spécifique, afin de tester la spécificité de l'hybridation.

Laisser incuber à une température précise, selon le  $T_m$  de l'hybride, pendant un temps entre 5 et 24 heures, selon les conditions expérimentales.

Une fois le temps écoulé, laver les puits avec 200  $\mu$ l de solution SSC 1X- SDS 0,25% à température d'hybridation pendant 2 min. Procéder à 2 lavages.

## VI.2. HYBRIDATION EN SANDWICH

### **- Principe :**

Cette technique est l'étape ultérieure de la technique précédente, faisant intervenir un 3<sup>o</sup> fragment d'ADN. Ce 3<sup>o</sup> fragment simple brin est complémentaire de la partie 5' (dans notre cas) de l'ADN cible et vient prendre ce dernier en sandwich avec le 1<sup>o</sup> fragment trappeur. Ce 3<sup>o</sup> fragment jouant alors le rôle de sonde est marqué et est donc détectable. (fig.MM10).

### **- Protocole :**

Le protocole à suivre est identique au précédent avec en plus l'ajout d'ADN sonde dénaturé après avoir mis l'ADN cible.

La quantité d'ADN sonde à ajouter doit être en excès par rapport à l'ADN cible et est à déterminer expérimentalement. Elle est contenue dans un volume de 10  $\mu$ l d'eau stérile pour donner un volume final de réaction de 220  $\mu$ l (200 $\mu$ l de solution d'hybridation + 10  $\mu$ l d'ADN cible + 10  $\mu$ l d'ADN sonde).

L'hybridation trappeur-ADN cible et ADN cible-sonde s'effectue donc en un temps.

## VII. REVELATION DE LA SONDE BIOTINYLEE EN BIOLUMINESCENCE

### - Principe :

La révélation de la sonde est basée sur un système de reconnaissance biotine - streptavidine. Cette streptavidine est couplée à la pyruvate kinase, ce qui entraîne une détection possible du complexe par réaction enzymatique en cascade faisant intervenir en dernier lieu la luciférase. Celle-ci, en présence de ses substrats, dont l'ATP, émet de la lumière quantifiable.

### - Protocole de reconnaissance par le conjugué :

Après les lavages de l'hybridation au NaOH 0,2 N, il faut procéder à un dernier lavage des puits avec une solution de SSC 0,2 X à 4°C pendant 5 min. Saturer ensuite les puits à la SAB (Sigma B-2518) afin d'empêcher la fixation non spécifique du conjugué streptavidine-pyruvate kinase au plastique. 200µl d'une solution de SAB (5mg/ml PBS) sont mis dans les puits pendant 30 min. à température ambiante. Rincer. Ajouter ensuite 250 µl/puits de la solution contenant le conjugué streptavidine-pyruvate kinase à une concentration de 40 µg/ml. Laisser la reconnaissance s'opérer pendant 1 heure à température ambiante. Rincer.

### - Protocole de révélation :

Préparation des différentes solutions :

- ADP : 2 ng d'ADP (Sigma A-4386)/ml de tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM PH 7,5
- tampon D : -Tris HCl 25 mM
  - DTT 75 µM
  - EDTA 125 µM (Merck)
  - $\text{MgCl}_2$  6,25 mM pH 7,75
- tampon HEPES (Janssen 1725788) 0,02 M contenant 1 mg de DTT, 4 mg d'EDTA, pH 7,75.

Ajouter 200 µl de la mixture réactionnelle dont la composition est la suivante :

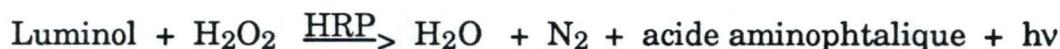
- 2 ml de solution d'ADP
- 8 ml de tampon D
- 200 µl luciférase (Sigma L-5256) : 20 ng/200 µl de tampon HEPES.
- 2 mg de phosphoénol pyruvate (PEP) (Sigma P-7127)
- 100µl de luciférine : 5 mg/ml de tampon D (Sigma L-9054)

Lire au Luminoskan (Titertek) l'émission de lumière (RLU/min) pendant une heure.

### **VIII. DETECTION DE LA SONDE BIOTINYLEE EN CHEMOLUMINESCENCE**

#### **- Principe :**

L'enzyme couplé à l'avidine est, ici, la peroxydase de Raifort (Horse Radish Peroxydase). Celle-ci catalyse une réaction d'oxydation du luminol par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



#### **- Protocole :**

Les différentes solutions utilisées sont :

- tampon de reconnaissance du conjugué: 100 ml de tampon PBS auquel sont ajoutés 11,7 g de NaCl (Merck), 1 g de MgSO<sub>4</sub> (Merck), 50 µl de Tween 20.
- solution de lavage: 100 ml de tampon PBS PH 7,2 contenant :
  - 1,22 g NaCl
  - 50 µl de triton X-100
- tampon A: - KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0,2 M PH 7,4
  - 5 mg de SAB/ml
- solution B: - 1 mg de luminol (Sigma)
  - 0,5 ml DMSO (Merck)
  - 24,5 ml de tampon A

- mixture luminol: - 9,5 ml de solution B
  - 0,5 ml DMSO
  - 1 mg de para phényl phénol (Sigma H-7751)

Le mode opératoire de détection est le suivant :

- incubation du conjugué: préparer une solution de 800 µg de conjugué/ml de PBS. Mettre 100 µl de cette solution par puits et laisser incuber 2 heures à température ambiante.
- lavage: laver 3 fois avec 200 µl de solution de lavage.
- mettre 100 µl/puits de mixture réactionnelle dont la composition est (pour 10 ml):
  - 7 ml de tampon A
  - 1 ml de mixture luminol
  - 2 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %
- lire directement au Luminoskan car l'émission de lumière est instantanée et ne dure qu'environ 5 min.

**RESULTATS ET DISCUSSION**

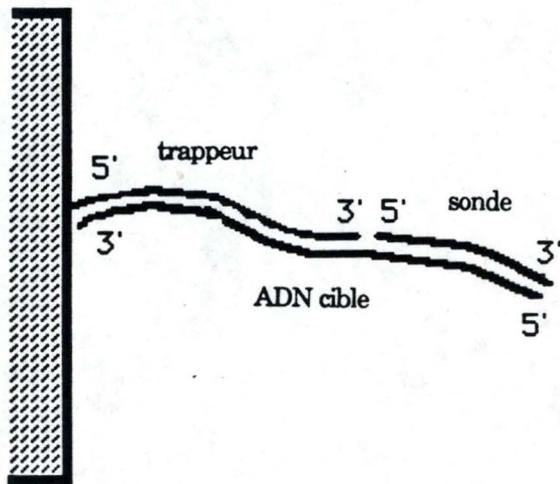


Figure 1 : représentation de la stratégie d'hybridation adoptée : L'hybridation en sandwich. L'ADN cible est pris en sandwich entre un fragment d'ADN fixé au support (le trappeur) et un fragment d'ADN marqué (la sonde).

## I. ETAPES PRELIMINAIRES A L'HYBRIDATION SUR PLASTIQUE

Le but de ce mémoire est de détecter un fragment d'ADN de *Chlamydia trachomatis* par un système d'hybridation de sonde nucléique révélée en bioluminescence.

De nombreuses techniques d'hybridation sur supports solides existant déjà, il fallu d'abord opter pour une stratégie d'hybridation et ensuite pour un support sur lequel nous allions le réaliser.

### I.1. STRATEGIE D'HYBRIDATION CHOISIE

Il s'agit d'une hybridation dans laquelle l'ADN cible est pris en sandwich entre un fragment d'ADN fixé au support (le trappeur) et un fragment d'ADN marqué (la sonde).

La méthode sandwich a été choisie pour sa double spécificité. En effet, la détection n'est réalisée si et seulement si il y a une double reconnaissance et de l'ADN trappeur et de l'ADN sonde par l'ADN cible. De plus, il entraîne une sensibilité plus grande. En effet, quand tout l'ADN d'un frottis, par exemple, sera mis à hybrider sur l'ADN trappeur, seul l'ADN cible (de *Chlamydia*) s'y accrochera et tout l'ADN contaminant sera éliminé en une seule étape par un simple lavage. Il suffira alors de détecter le fragment d'ADN cible par la sonde marquée. Après avoir examiné plusieurs possibilités concernant la longueur des différents fragments, nous avons choisi la construction représentée figure 1 pour ses conditions d'hybridation avantageuses.

En effet, la théorie a servi de base pour le choix de la longueur des différents fragments utilisés dans ce travail:

- Concernant la longueur de l'ADN cible: la stratégie se base sur la détection d'un fragment d'ADN de la bactérie d'environ 500 pb. Celui-ci est flanqué à ses deux extrémités d'un même site de restriction afin de l'isoler de tout l'ADN génomique et plasmidique contenu dans l'échantillon.

- Concernant la longueur de l'ADN trappeur: on pourrait utiliser un oligo comme trappeur et le faire syntétiser par un sythétiseur de manière à disposer d'une quantité importante de matériel. Dans ce cas, on devrait se mettre dans des conditions de basse température (peu stringente). Ceci favorise les interactions pour les oligo, mais aussi pour l'ADN. Ce dernier peut alors soit

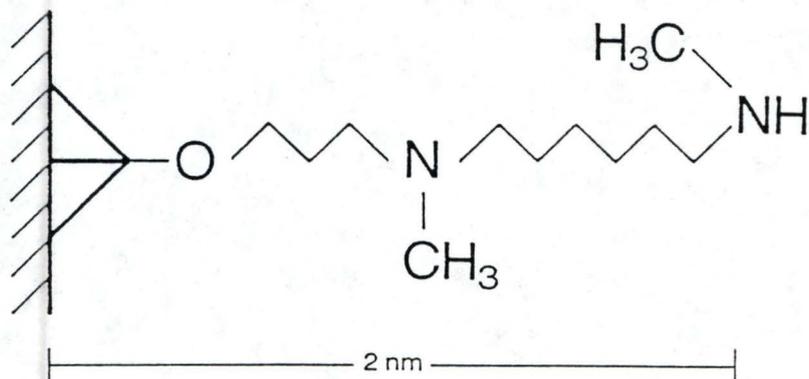


Figure 2 : Configuration schématique de la surface des plaques multi-puits Covalink.

former des doubles brins, soit former des loops ou encore s'hybrider de manière non spécifique. C'est pourquoi nous avons choisi de prendre un brin d'ADN plus grand à fixer sur le plastique et de réaliser l'hybridation trappeur-ADN cible dans des conditions d'hybridation valables pour de longues chaînes d'ADN (c'est à dire plus stringentes).

Un autre facteur déterminant, est que plus le trappeur est petit par rapport à l'ADN cible, moins l'hybride est stable. Un trappeur d'environ 300 pb serait l'idéal. En effet, 300 pb hybridées sur les 500 pb de l'ADN cible, représentent 60 % de l'ADN cible et celui-ci sera donc bien accrochés au trappeur. De plus, l'homologie de séquence qui est de 100 % entre les deux, ce qui permet une stabilité maximale.

La vitesse de réaction sur un support est environ 10 X plus faible que la vitesse en solution. La vitesse en solution est proportionnelle à L (L= longueur de la chaîne), alors qu'elle est proportionnelle à 1/L sur le support en excès de sonde, ce qui est le cas des expériences. Il faut donc pour éviter la réassociation des chaînes en solution avoir un ADN cible de longueur plus petite (un fragment de  $\pm 500$ pb au lieu de tout l'ADN de la bactérie) et/ou avoir un trappeur plus long (de  $\pm 300$  pb au lieu d'un oligo).

## 1.2. SUPPORT SOLIDE CHOISI

Les différentes méthodes d'hybridation en phase solide sont basées sur l'immobilisation de l'ADN généralement sur membranes de nitrocellulose ou de nylon. Mais cette immobilisation comporte des désavantages:

- l'ADN est lié de façon non covalente
- Les problèmes de diffusion posés par la présence du filtre réduisent fortement la vitesse de réaction.
- l'ADN se fixe au support en de multiples sites

Or, l'idéal serait de fixer l'ADN de façon covalente et en un seul point de la molécule.

Ce type de liaison a été décrite pour la première fois par Gilham (Gilham P.T., 1968) qui à l'aide du carbodiimide a fixé de l'ADN sur papier par l'extrémité 5' phosphorylée. Plus tard, d'autres essais, toujours médiés par le carbodiimide, ont été réalisés sur particules de latex (Wolf, S.F. *et al.*, 1987), de verres poreux (Ghosh S.S. *et al.*, 1987), de dextran (Gingeras T.R. *et al.*, 1987) ou encore sur des perles de polystyrènes magnétiques (Lund V. *et al.*, 1988).

Genre	CHLAMYDIA				
Espèce	trachomatis			psittaci	pneumoniae
biotype	trachome		LVG	souris	
sérotype	A à C infection oculaire	D à K infection sexuelle	L1,L2,L3 infection lymphatique		
% homologie de séquence par rapport à la séquence du trachome (la référence)	100%		96-97%	30-60%	>10%

Figure n°3 : Tableau de classification du genre *Chlamydia* .  
*Chlamydia psittaci* : infection des macrophages des alvéoles pulmonaires, du foie et de la rate provoquant des pneumonies et asphyxies progressives.  
*Chlamydia pneumoniae* : infection des cellules épithéliales des poumons provoquant des pharyngites, des bronchites et des pneumonies.

Table  
 Differentiation of the three biovars of *Chlamydia trachomatis*\*

Characteristics	Biovar		
	Trachoma	Lympho- granuloma venereum	Mouse
Natural host:			
Humans	+	+	-
Mice	-	-	+
Preferred site of infection in natural hosts:			
Squamocolumnar epithe- lium cells	+	-	-
Lymph nodes	-	+	-
Lungs	-	-	+
Behavior in laboratory ani- mals:			
Intracerebral lethality for mice	-	+	-
Follicular conjunctivitis in primates	+	-	-
Behavior in cell culture:			
Plaques in L cells	-	+	+
Infection markedly en- hanced by:			
Centrifugation onto cell sheet	+	-	-
Treatment of host cells with diethyl- aminoethyl-dex- tran	+	-	-
No. of serovars	12	3	NA
% DNA homology with tra- choma	100	100	30-60

\* Symbols: see standard definitions; also NA = data not available.

Figure n° 4 : Tableau reprenant les caractéristiques des trois biotypes de *Chlamydia trachomatis* (Storz et Page 1971)

D'un autre côté, l'hybridation sur plaques multipuits, grâce à sa manipulation facile, est une méthode très prometteuse dans le domaine du diagnostic. En effet, les plaques multipuits en polystyrène sont conçues pour l'utilisation de sondes fonctionnant avec un enzyme (alors que certains enzymes, comme la luciférase, s' inactivent au contact des filtres de nitrocellulose) évitant le recours à la radioactivité. De plus un équipement automatique de lecture rend possible des tests de grandes quantités d'échantillons dans des conditions faciles et de sécurité.

Jusqu'à présent la limitation de l'hybridation sur plaques multipuits était l'immobilisation de l'ADN en surface des puits.

L'immobilisation peut être obtenue par adsorption passive (Inouye S *et al.*, 1990), grâce à la lumière U.V. (Nagata Y. *et al.*, 1985), par liaisons covalentes de nucléotides modifiés (Keller G.H. *et al.*, 1988 et 1989). Malheureusement, ces méthodes présentent les mêmes désavantages que sur nitrocellulose.

A/S Nunc (société danoise) a développé un nouveau type de plaques multipuits: les plaques Covalink NH (Rasmussen *et al.*, 1991). Il s'agit de puits en polystyrène sur la surface desquels sont greffés des bras terminés par une amine secondaire (Rasmussen, S.E. 1990). (fig.2)

Cette amine secondaire permet un lien covalent (phosphoramidate) avec le phosphate de l'extrémité 5' de l'ADN. Grâce à ce lien solide, des conditions d'hybridation très stringentes sont possibles sans pour autant détacher l'ADN fixé. De plus, l'ADN étant fixé uniquement par son extrémité 5', cette fixation répond aux conditions idéales en vue d'une hybridation.

### I.3. SEQUENCE D'ADN CHOISIE

#### A./ But du travail

L'ambition de ce travail est de détecter de l'ADN de *Chlamydia trachomatis* des sérotypes D à K responsables des infections des voies sexuelles ainsi que les sérotypes L1, L2 et L3 responsables du lymphogranulome vénérien. Il s'avère en fait que l'homologie de séquence est quasi totale non seulement entre les deux sérotypes du biotype du trachome, mais aussi entre le biotype du trachome et celui du lymphogranulome vénérien (fig.3) rendant impossible une détection

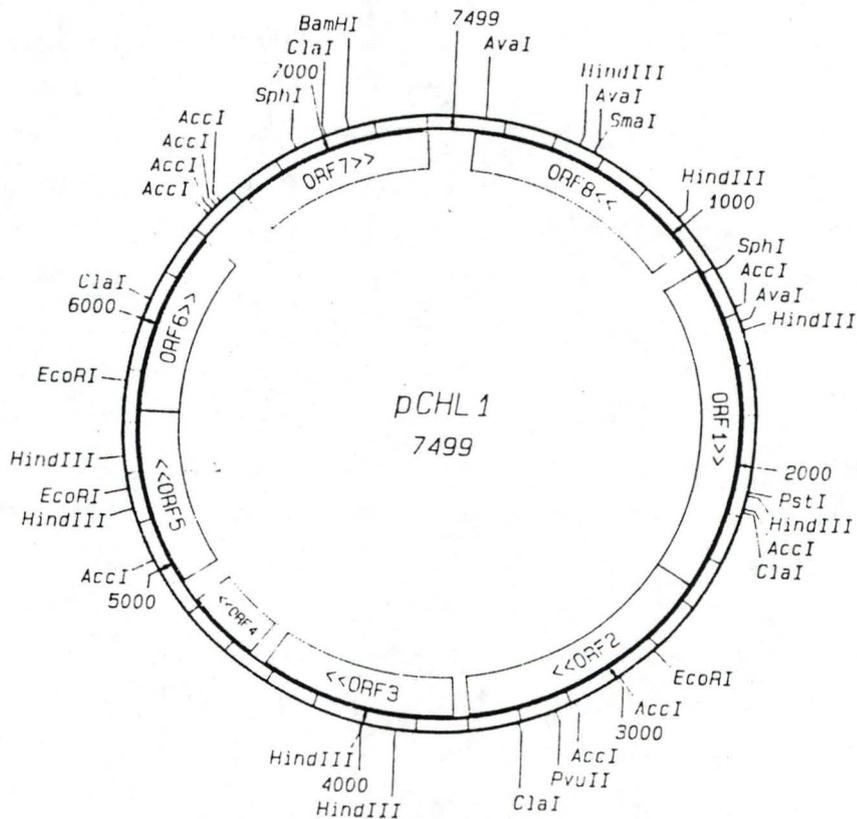


Figure 5 : Carte des sites de restriction du plasmide de *Chlamydia trachomatis* du sérotype L1. Le fragment choisi se situe dans l'ORF 5 et 6 entre deux sites de restriction ECOR1 (entre la 5340 et le 5755 ème base). un site de restriction Hind III permet sa digestion en deux fragments: un de 289 et un de 126 paires de bases.

distincte uniquement sur base des séquences. Cependant, si la distinction entre les deux sérotypes du trachome n'est pas possible au niveau des séquences, elle l'est au niveau des sites d'infection et autres caractéristiques (fig.4). Ainsi, sachant que les échantillons viennent de frottis vaginaux, il est impossible d'y trouver les sérotypes de A à C responsables des infections oculaires. Si la sonde répond à l'ADN extrait d'un frottis vaginal, c'est que nécessairement nous avons à faire à un des sérotypes de D à K, L1, L2 ou L3.

#### B/ Recherche d'une séquence plasmidique spécifique

Notre recherche d'une séquence spécifique pour *Chlamydia trachomatis* s'est directement orientée vers le plasmide pour la bonne raison qu'étant présent en une dizaine (7 à 10) d'exemplaires par bactérie, sa détection confère déjà une amplification du signal. De plus nous savions qu'une certaine séquence de 22 pb est répétée quatre fois par plasmide amplifiant d'avantage le signal. Malheureusement, cette séquence convoitée était déjà brevetée pour des travaux similaires.

Nous avons travaillé sur 5 séquences du plasmide de *Chlamydia tr.* correspondant à des sérotypes différents. Un alignement de ces 5 séquences montre leur homologie presque totale. Le choix d'une séquence homologue parmi tout le plasmide étant très large, nous avons tout le loisir de choisir une séquence qui répondait aux conditions imposées par la stratégie adoptée. L'avantage d'utiliser une séquence homologue est la possibilité de détecter les divers sérotypes avec le même test.

La théorie concernant l'hybridation ainsi que la stratégie que nous avons choisie nous impose de trouver une séquence d'environ 500 pb flanquée aux deux extrémités d'un même site de restriction. Nous voulions de plus, que cette séquence comprenne un autre site de restriction qui permettrait sa digestion en deux fragments. Le plus long servirait de trappeur en étant fixé sur le plastique tandis que le plus court serait marqué pour servir de sonde.

Cette séquence fut trouvée entre l'ORF 5 et l'ORF 6 du plasmide. D'une longueur de 415 pb, elle est flanquée à ses deux extrémités du site EcoR1. Elle contient en plus, un site Hind III à environ 1/3 du fragment générant ainsi un fragment long (289 pb) et un fragment court (126 pb) comme désiré (fig 5).

#	Name	6 Entries that match criteria	Length	Date	Similarity
1	CH1L1CG	Plasmid pCHL1 (from C.trachomatis)...	7502	15/09/90	True (415 1:415/5340:5755)
2	CHTORF	C.trachomatis plasmid pCTT1 DNA wi...	7496	15/12/88	True (415 1:416/5332:5748)
3	CHTP	Chlamydia trachomatis plasmid DNA ...	7499	15/09/89	True (415 1:415/4940:5355)
4	CHTPCPA1	C.psittaci plasmid pCpA1 (avian Ch..	7553	06/12/91	True (52 7:396/6571:6960)
5	CHTPLAS75	C. trachomatis plasmid DNA for gro...	7499	15/09/89	True (415 1:415/4940:5355)
6	CHTPLASCG	C.trachomatis cryptic plasmid pLGV...	7498	15/03/90	True (415 1:415/5338:5753)

**Figure 6 :** Test de similarité entre la séquence de 415 paires de bases choisie du sérotype L1 et les 65000 autres séquences contenues dans la banque de données Genbank. Seules les séquences plasmidiques des autres types de *Chlamydia trachomatis* sont similaires à cette séquence. une séquence de 52 paires de bases contenues dans ce fragment de 415 pb se retrouve dans le plasmide de *Chlamydia psittaci*.

Il restait à s'assurer que cette séquence, que l'on sait déjà commune aux cinq sérotypes testés dans la genbank, ne se trouve dans aucune autre séquence de la banque (qui en contient 65000), nous assurant sa spécificité au plasmide de *Chlamydia tr.*(fig.6). Le schéma figure 1 peut alors être complété (fig.7).

La figure 8 resitue dans le contexte du kit de détection de *Chlamydia trachomatis* appliqué à des échantillons cliniques (frottis vaginaux), l'origine des différents fragments d'ADN impliqués dans le système de détection de la bactérie.

## II. PREPARATION DES DIFFERENTS FRAGMENTS D'ADN

### II.1. LE PLASMIDE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

- La culture cellulaire de cette bactérie n' étant pas évidente et demandant beaucoup de pratique, de sécurité et de matériel adéquat, nous avons plutôt cherché à nous procurer l'ADN de *Chlamydia* qu' à le produire nous-même.

C'est auprès de Lindy Palmer (de l'Université de Davis en Californie) connue pour ses travaux sur *Chlamydia* que nous nous sommes procurés l'ADN plasmidique de trois sérotypes de *Chlamydia tr.*: sérotype L2 , D et E.

- Le plasmide de 7,5 kb est cloné dans PBR322 de 4,4 kb (fig.9) au site unique de restriction BamH1 et est appelé respectivement pour chaque sérotype PCHL2, PCHL5 et PCHL6 (fig.10). Ils nous ont été remis sous forme lyophilisée. L'ajout de 100 µl d'eau stérile a reconstitué des solutions contenant respectivement 10 µg de PCHL2, 1 µg de PCHL5 et 1 µg de PCHL6 dans le tampon TE.

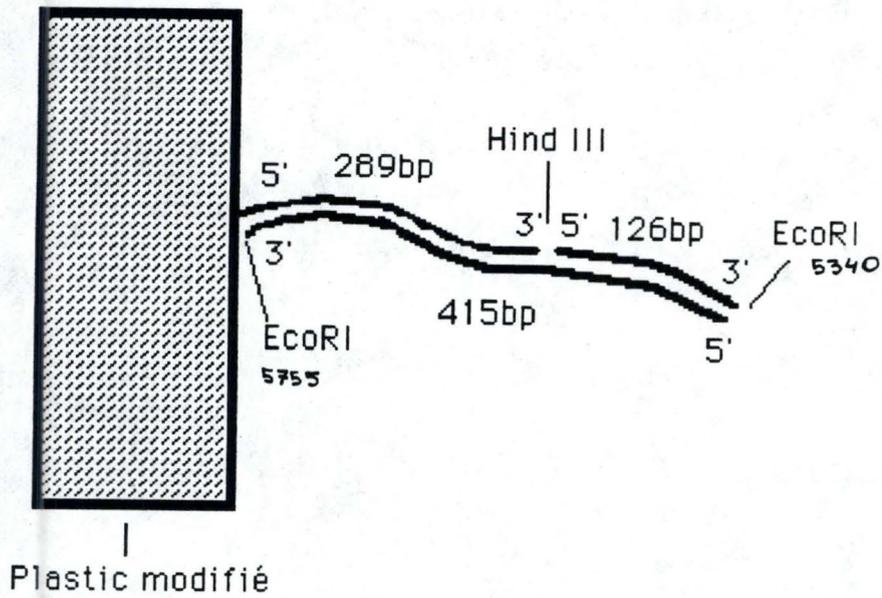


Figure 7 : Représentation schématique de l'hybridation en sandwich de l'ADN cible (415 pb) par le trappeur de 289 pb et la sonde 126 pb. Les sites de restriction avec leur position dans le plasmide sont également représentés.

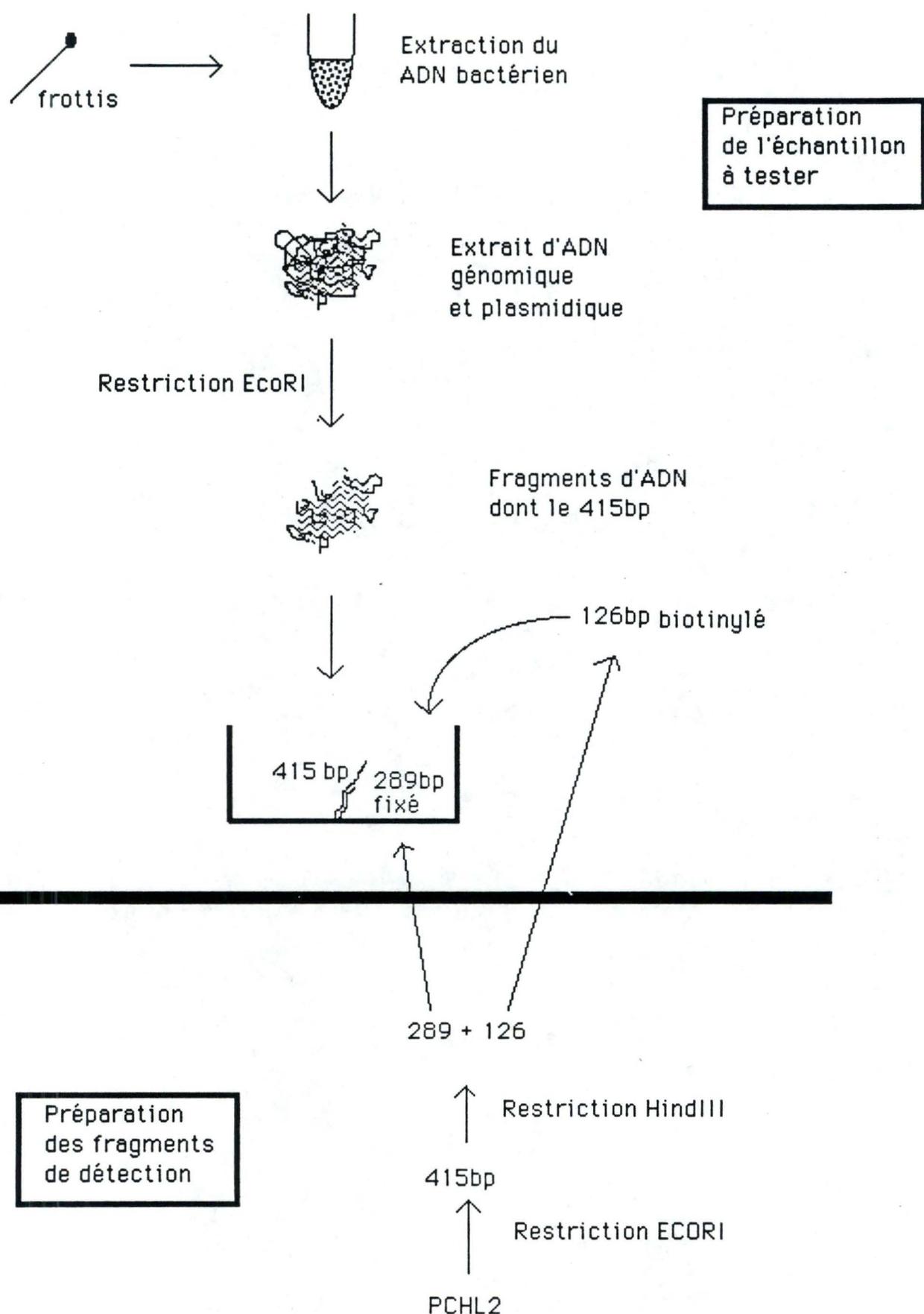


Figure 8 : Origine des différents fragments d'ADN impliqués dans le système de détection de *Chlamydia trachomatis* lors d'un test échantillon clinique.

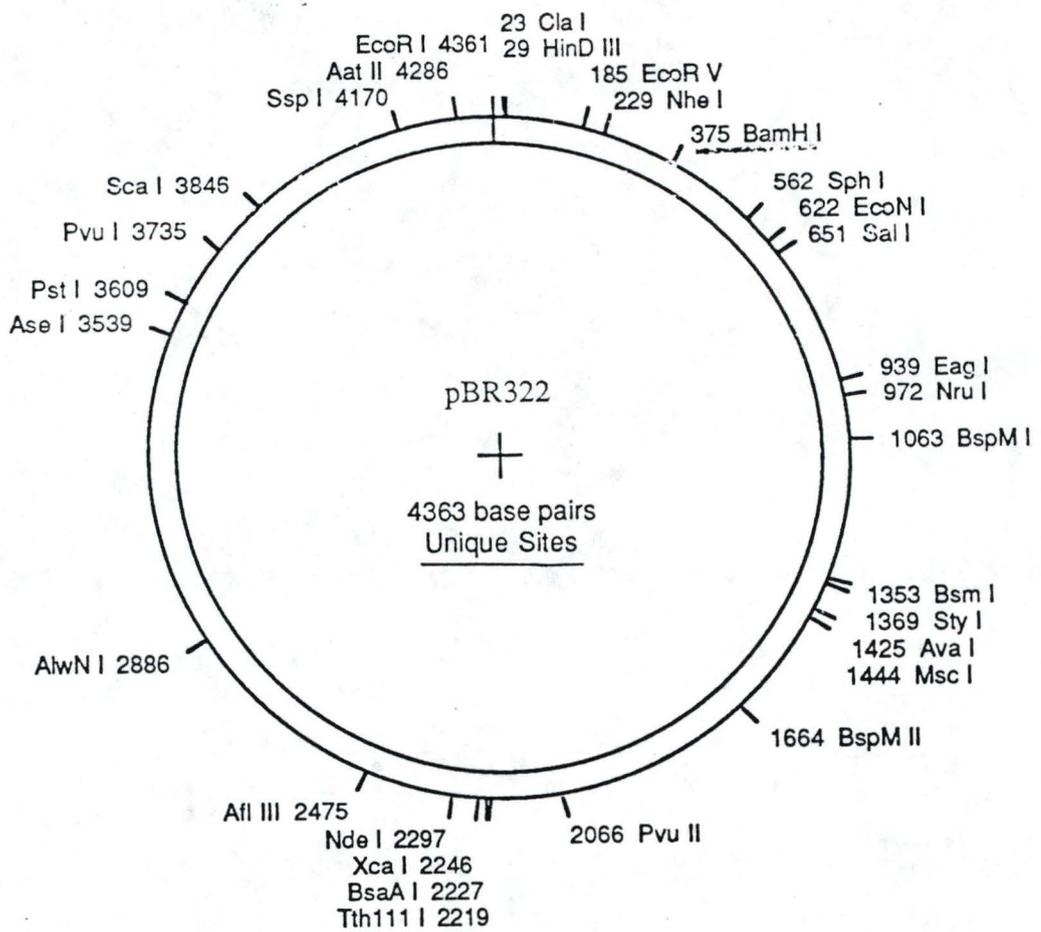
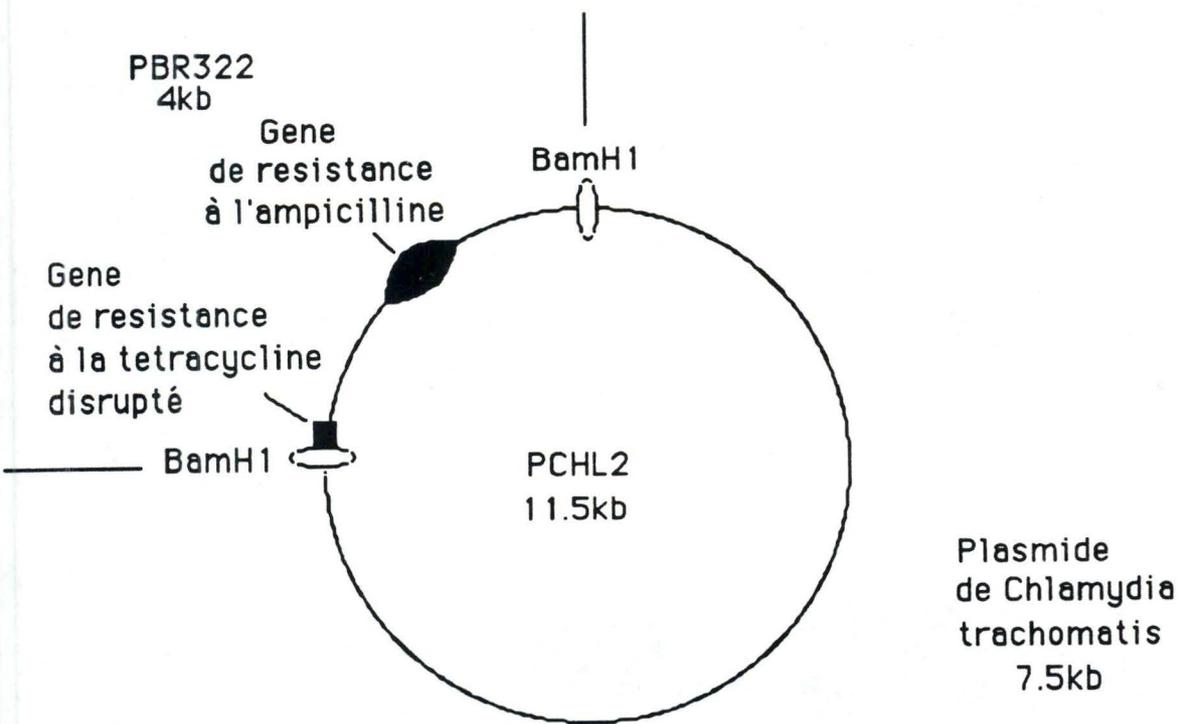


Figure 9 : Carte des sites uniques de restriction de PBR322 .



Les recombinants sont tétracycline sensibles et ampicilline résistants

Figure 10 : Le plasmide de *Chlamydia trachomatis* (7,5 kb) inséré dans PBR322 (4,3 kb) au site de restriction BamH1 disruptant le gène de résistance à la tétracycline de PBR322. Le gène de résistance à l'ampicilline restant intacte, les recombinants sont donc tétracycline sensibles et ampicilline résistants.

λ

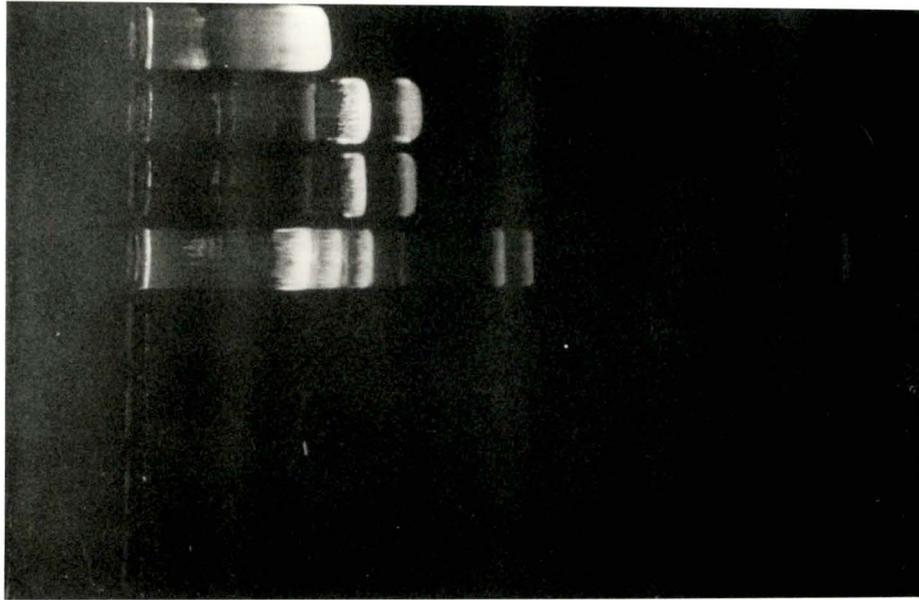


Photo n°1 :

Ligne 1 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% de l'ADN de PCHL2 entier.

Ligne 2 et 3 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% de PCHL2 digéré par BamH1 séparant le fragment de 7,5kb (plasmide de *Chlamydia trachomatis*) et le fragment de 4,3 kb (PBR322).

Le marqueur de poids moléculaire utilisé est l'ADN du phage lambda digéré par HindIII donnant des bandes de 23, 9, 6, 4, 2.3, 0.5, 0.125 kb (ce dernier n'étant pas visible sur la photo).

## II.2. PRODUCTION DU FRAGMENT DE 415 BP PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

### A/ Transformation et maxiprep

Une transformation de cellules compétantes XL Blue par PCHL2 suivie d'une maxiprep nous a produit de l'ADN de PCHL2 en bonne quantité : 100µl de solution d'ADN à concentration de 6 mg/ml dans le tampon TE. Pour vérifier qu'il s'agisse bien de l'ADN attendu, nous l'avons fait migrer sur un gel d'électrophorèse (agarose 0,8 %) avec le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$  digéré par Hind III (Boeringer Manheim. n° 236250).

La ligne 1 de la photo n°1 nous montre bien un segment d'ADN de  $\pm$  11,9 kb qui est bien la somme de 7,5 kb (le plasmide de *Chlamydia*) et 4,4 kb (PBR322).

B/ Séparation du plasmide et de PBR322 par une restriction au site d'insertion BamH1.

Nous avons réalisé une digestion de PCHL2 (le plasmide de *Chlamydia* clôné dans PBR322) et analysé sur gel d'électrophorèse les fragments générés.

Les lignes 2 et 3 de la photo n°1 montrent une bande de 7,5 kb et de 4 kb correspondant au plasmide et à PBR322. De là, nous pensions pouvoir récupérer assez d'ADN plasmidique (par la méthode utilisant les membranes DEAE) que pour pouvoir travailler avec cet ADN isolé. Malheureusement, la quantité d'ADN récupérée était trop faible que pour pouvoir continuer le travail (photo n°3).

Nous avons donc décidé de travailler avec PCHL2 entier pour éviter cette étape.

### C/ Récupération du fragment de 415 pb

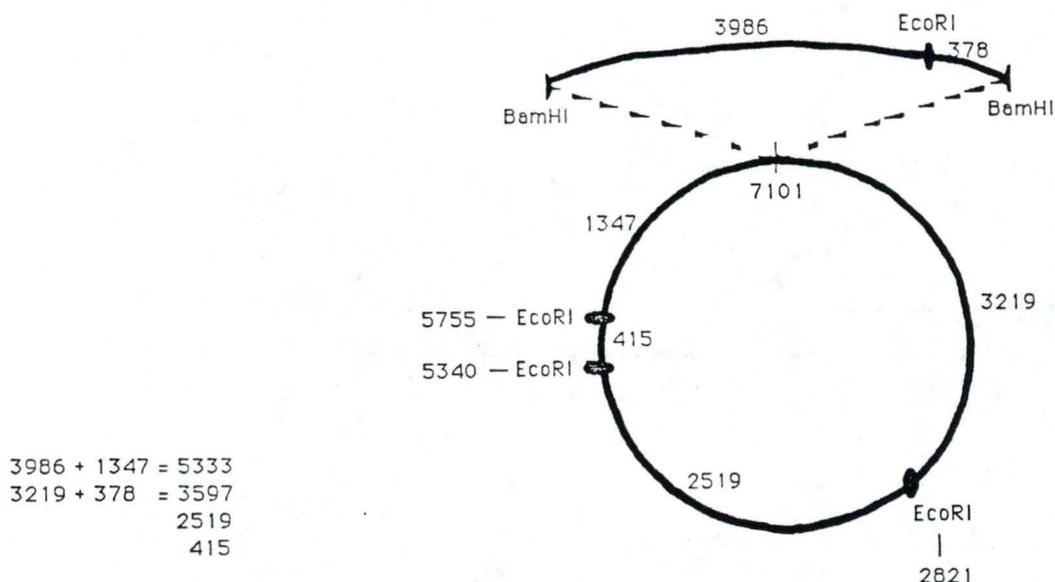
Partant de l'ADN de PCHL2 entier, une restriction par EcoR1 nous donne le fragment de 415 pb. Celui-ci, bien isolé des autres fragments de taille beaucoup plus grande rend l'extraction par membranes DEAE facile (fig.11).



Photo n°3 : 1° ligne: PCHL2 non restreint  
2° ligne: PCHL2 restreint par BAMHI.  
3° ligne: Marqueur de poids moléculaire  $\lambda$   
4° ligne: Plasmide de *Chlamydia* isolé  
5° ligne: PBR322 isolé

La concentration d'ADN plasmidique et de PBR322 après séparation est si faible ( $< 1 \mu\text{g/ml}$  c'est à dire  $0,005 \mu\text{g/puits}$ ) que les bandes ne sont pas visibles sur le gel.

PREMIER SENS D'INSERTION POSSIBLE



DEUXIEME SENS D'INSERTION POSSIBLE

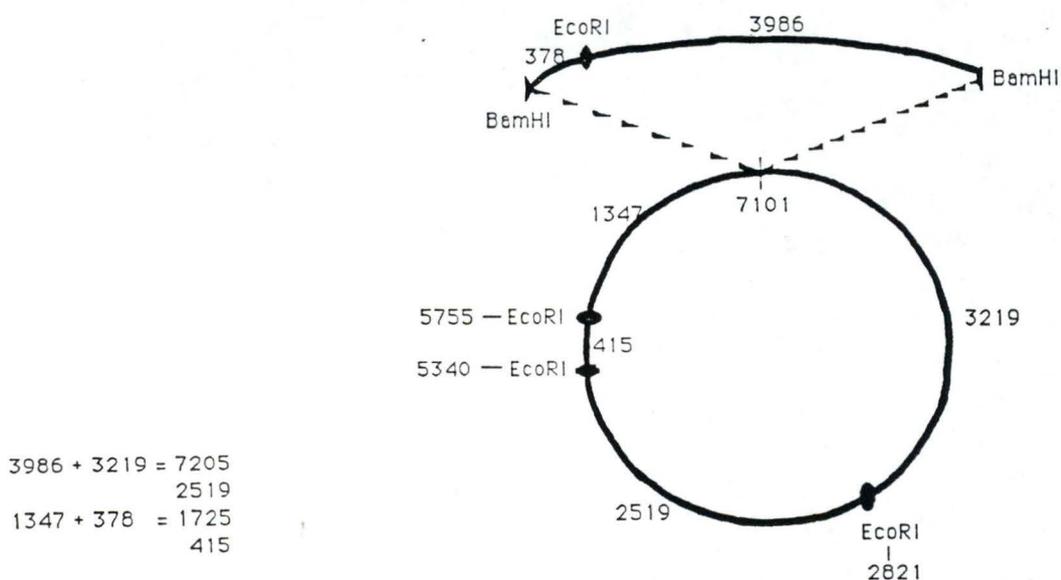


Figure 11 : Selon le sens d'insertion de PBR322 dans le plasmide de *Chlamydia*, les fragments générés par la restriction ECORI. sont de longueurs différentes. Mais quel que soit le sens d'insertion, le fragment de 415 pb est présent et bien distinct de tous les autres facilitant ainsi son extraction du gel

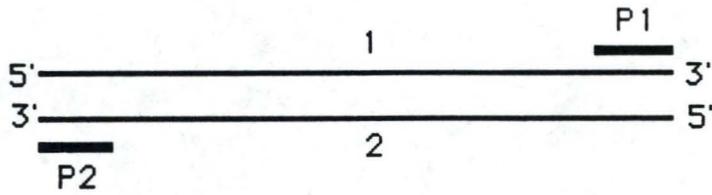


Figure 12 : Schéma des éléments en présence pour la réalisation d'une PCR. Les primers utilisés sont constitués des 20 paires de bases situés aux extrémités 3' des deux brins du fragment de 415 paires de bases à amplifier. P1 = Primer 1 et P2 = Primer 2.

1ng  
 0,1ng  
 0,01ng  
 1Pg  
 0,1Pg  
 0Pg  
 λ



Photo n°4 : Produit d'une PCR avec comme ADN matrice PCHL2 à différentes concentrations. La meilleure amplification (400000x) a été obtenue pour la concentration en PCHL2 de 0,1ng/100μl. Le marqueur de poids moléculaire est le phage lambda digéré par HindIII.

Cependant, nous constatons encore des pertes d'ADN au cours du traitement des membranes. Sachant que ce fragment de 415 pb devait encore servir afin d'isoler le fragment trappeur du fragment sonde, et donc de perdre d'avantage d'ADN, nous avons préféré abandonner cette méthode laborieuse et peu rentable.

C'est ainsi que nous nous sommes tournés vers la technique de PCR pour, dans un premier temps, amplifier le fragment de 415 pb à partir de PCHL2 entier.

### II.3. UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR PRODUIRE LES DIFFERENTS FRAGMENTS

Comme décrit dans les matériels et méthodes, la technique de PCR permet d'amplifier un grand nombre de fois une séquence précise à partir d'un ADN matrice.

#### A/ Amplification du fragment de 415 pb

Les primers utilisés sont constitués des 20 pb situées aux extrémités 3' des deux brins du fragment (fig. 12).

séquence de P1 : 5' GAATTCTTAAGTTCGGTCGG 3'

séquence de P2 : 5' GAATTCAAAGTTGCTGAGAA 3'

Ils ont été synthétisés par un appareil de marque Applied Biosystems 381A (USA) au laboratoire de Physiopathologie (Mr. Goffinet), dans une solution aqueuse à concentration en primer de 18,8 mg/ml (solution stock).

Pour la PCR, nous avons dilué 30X cette solution stock, ce qui donne une solution de concentration en primer de 630 ng / $\mu$ l soit  $10^{-10}$  mole/ $\mu$ l.

- L'ADN matriciel est PCHL2 (11,9 kb).

Notre première expérience PCR avait pour but de tester différentes concentrations d'ADN matriciel afin d'utiliser la plus rentable.

Cinq concentrations ont été testées: (ng/100 $\mu$ l)

1ng, 0,1ng, 0,01ng, 1pg, 0,1pg, 0pg=blanc

La plus grande amplification obtenue est de 400 000 X et a été observée pour la concentration de 0,1ng/100 $\mu$ l (photo n°4). C'est dorénavant cette concentration que nous utiliserons .

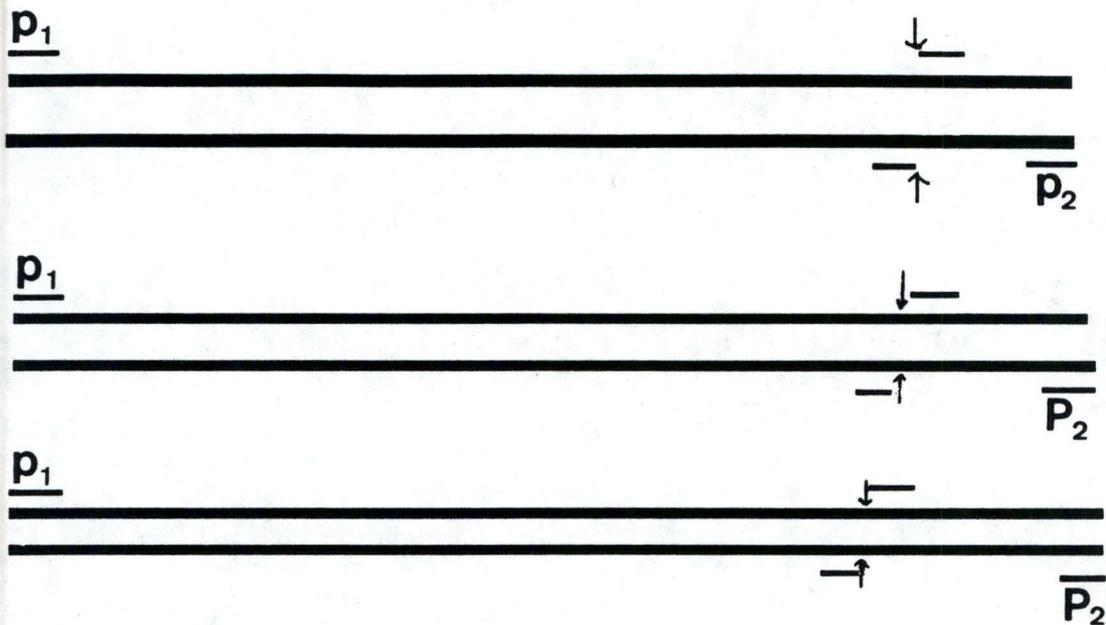


Figure n°12' : La séquence du fragment trappeur et du fragment sonde peuvent commencer à de multiples endroits du fragment cible de 414 pb. Le choix de leur séquence est cependant restreint par le fait qu'une des extrémités de ces fragments servira de primer à leur amplification (avec le P1 et le P2). Il faut donc chercher, parmi la séquence de 414 pb, une séquence répondant aux critères généralement pris en compte dans le choix de primers.

## B/ Amplification des trois types de fragments par PCR

Les conditions de PCR mises au point nous permettaient d'amplifier le fragment de 415 pb avec un bon rendement et sans trop de mal. Cependant, il fallait encore produire les fragments trappeurs et sondes toujours par la méthode de restriction enzymatique suivie d'une récupération d'ADN sur membrane DEAE ce qui entraîne des pertes importantes. Nous avons alors abandonné cette idée prévue initialement et décidé de produire les deux autres fragments séparément par PCR, ce qui représentait un gain de temps considérable.

Amplifiant chaque type de fragment séparément, il n'y avait donc plus lieu de restreindre le fragment de 415 pb. L'obligation d'avoir un site de restriction dans la séquence n'ayant plus de raison d'être, le schéma initial (voir fig.7) pouvait être repensé.

Nous garderons toujours le même fragment de 415 pb, mais la séquence des deux autres fragments peut être changée parmi ces 415 pb. Ceci, afin de nous mettre dans de bonnes conditions pour obtenir une amplification efficace en PCR.

En effet, sachant que la séquence aux extrémités des fragments servirait de primer, les critères de choix pour l'extrémité du trappeur et de la sonde devaient être les suivants : (fig.12' )

une séquence de  $\pm 40$  pb - située à environ 1/3 du fragment de 415pb,

- riche en bases G et C afin de produire des primers stables,
- donnant des primers spécifiques qui n'amplifient que le fragment désiré.

Après examination de la séquence plasmidique, deux séquences répondant à ces critères, ont été retenues. Ces deux séquences furent testées par le programme informatique amplify afin de vérifier qu'elles soient de bons primers.

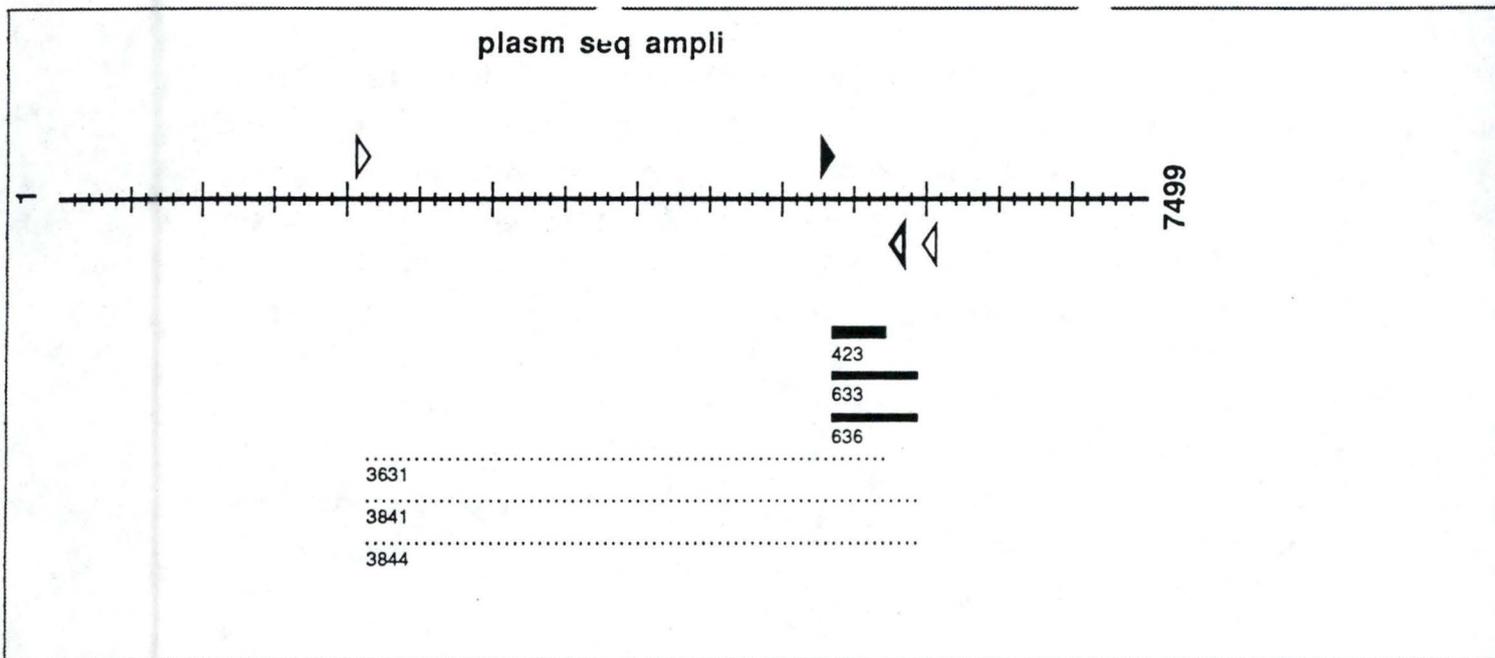


Figure n°13 : Test de l'efficacité des P1 et P2 à amplifier le fragment de 415 pb par le programme amplify simulant une réaction de PCR.

La ligne horizontale graduée représente la séquence du plasmide de *Chlamydia trachomatis* (7,5 Kb).

P1 = ▴

P2 = ◁

Le primer est d'autant plus stable que le triangle, représentant le primer est noirci:

Le primer s'accroche très bien à l'ADN matrice = ▴

Le primer s'accroche bien à l'ADN matrice = ◁

Le primer s'accroche faiblement à l'ADN matrice = ▽

Les fragments amplifiés sont représentés avec leur nombre de paire de bases par des barres horizontales noircies. Le fragment est en quantité d'autant plus grande que la barre horizontale noircie est épaisse.

Les lignes en pointillés représentent des fragments très faiblement amplifiés avec leur nombre de paire de bases.

Remarque: Cette figure montre un fragment de 423 pb amplifié au lieu de 415 pb comme calculé à partir des sites de restrictions. Les 8 paires de bases de différence sont dues à la façon de compter les pb à partir du milieu ou de l'extrémité du site de restriction.

- Utilisation du programme Amplify

Pour des séquences de primers et une matrice d'ADN donnée, le programme Amplify permet de savoir si les primers sont bien stables, s'ils s'accrochent spécifiquement à la séquence complémentaire, quels fragments ils génèrent (fragment désiré et fragments contaminants) et en quelle quantité.

Ce programme nous a tout d'abord permis de tester le primer 1 et 2 que nous utilisions déjà pour amplifier le fragment de 415 pb. Ces deux primers avaient été initialement choisis comme les 20 pb à l'extrémité 3' des deux brins du fragment de 415 pb à amplifier.

Les résultats (fig.13) ont montré que le P1 était assez spécifique, mais que le P2 l'était moins générant de ce fait des fragments non désirés en quantités assez importantes.

Il a suffi d'ajouter 3 bases de plus au P2 pour le rendre tout à fait spécifique et ainsi éliminer toute amplification de fragments non désirés. Ce nouveau primer est appelé P5. Le primer 1, lui, reste tel quel. Dès lors, les PCR réalisées à partir de PCHL2 (le plasmide de *Chlamydia* cloné dans PBR322) avec le P1 et P5 donnent uniquement le fragment désiré (fig.14a et 14b).

- Le même test a été appliqué aux deux séquences retenues qui sont les suivantes:

P6 = 5' CGCGTTCATATTCGATATGC 3'

P7 = 5' CTCTCAGAGGACAACGTGAACAA 3'

Le P6 et le P1 permettent d'amplifier un fragment de 288 pb tandis que le P7 et le P5 amplifient un fragment de 124 pb

Vu leur très grande spécificité, ils nous donnent exclusivement les fragments désirés (fig.15 et 16).

Le schéma d'hybridation définitif est représenté à la figure 17.

- Les nouveaux primers furent synthétisés par Eurogentec (Liège). La photo n°5 montre les résultats d'une PCR réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant les nouveaux primers. Nous obtenons une bonne amplification des divers fragments d'ADN. Nous avons obtenu des concentrations d'environ 40 µg d'ADN/ml.

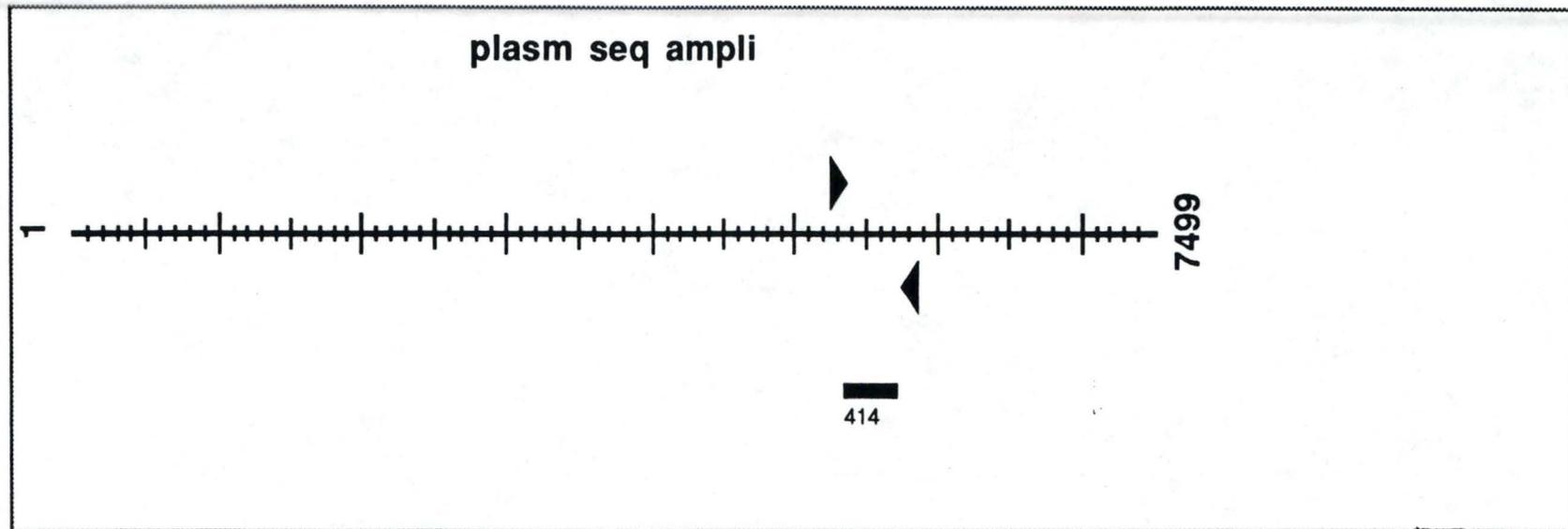


Figure n°14a : Test de l'efficacité de P1 et P5 à amplifier le fragment de 415 pb à partir du plasmide de *Chlamydia* par le programme Amplify simulant une réaction de PCR.

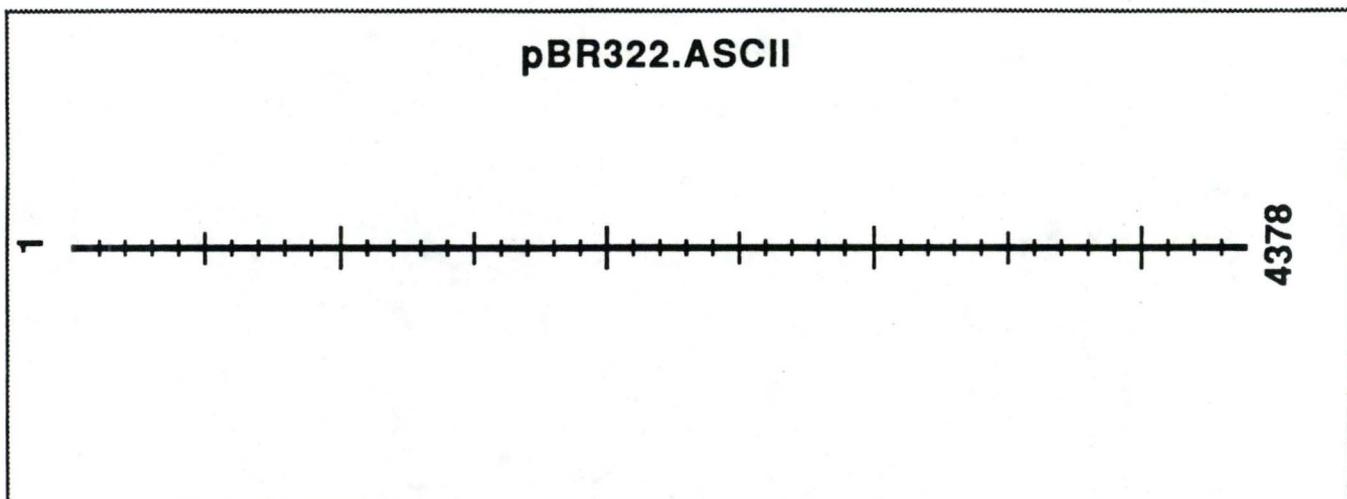


Figure n°14b : L'ADN matrice utilisé réellement pour réaliser les PCR étant PCHL2 (le plasmide de *Chlamydia* cloné dans PBR322) nous avons également vérifié que ces deux primers ne s'accrochent en aucun endroit de la séquence de PBR322, ce qui génèrerait des fragments autres que celui de 415 pb de *Chlamydia* . Les primers P1 et P5 sont bien spécifiques de la séquence plasmidique de *Chlamydia* et ne s'accrochent en aucun endroit de la séquence de PBR322.

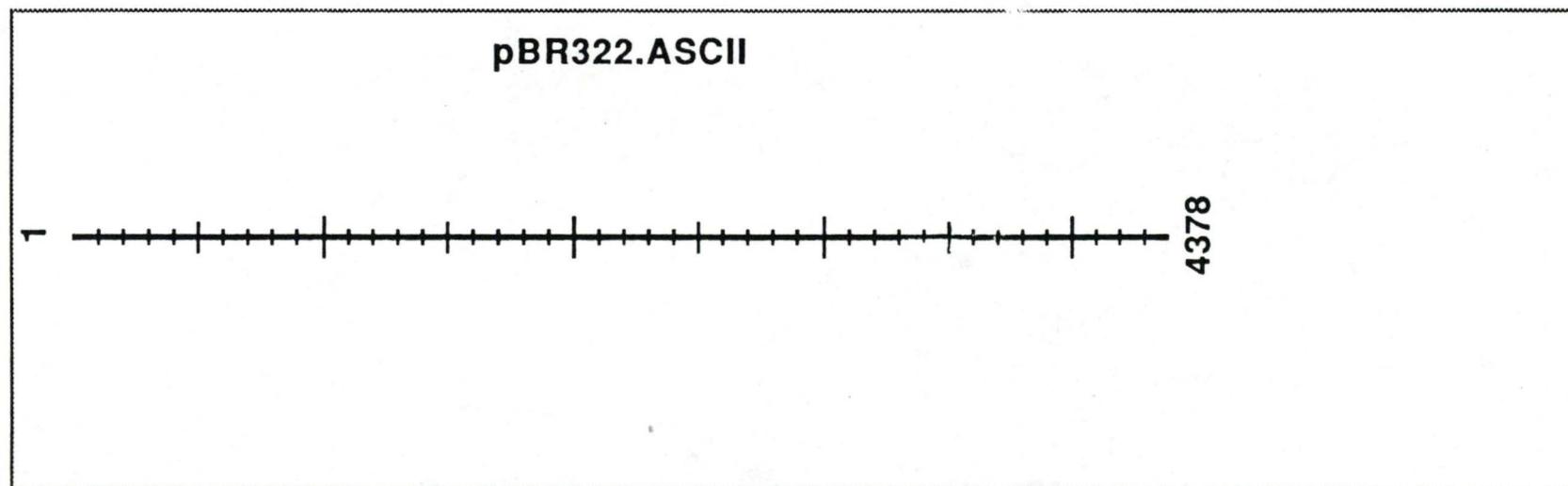
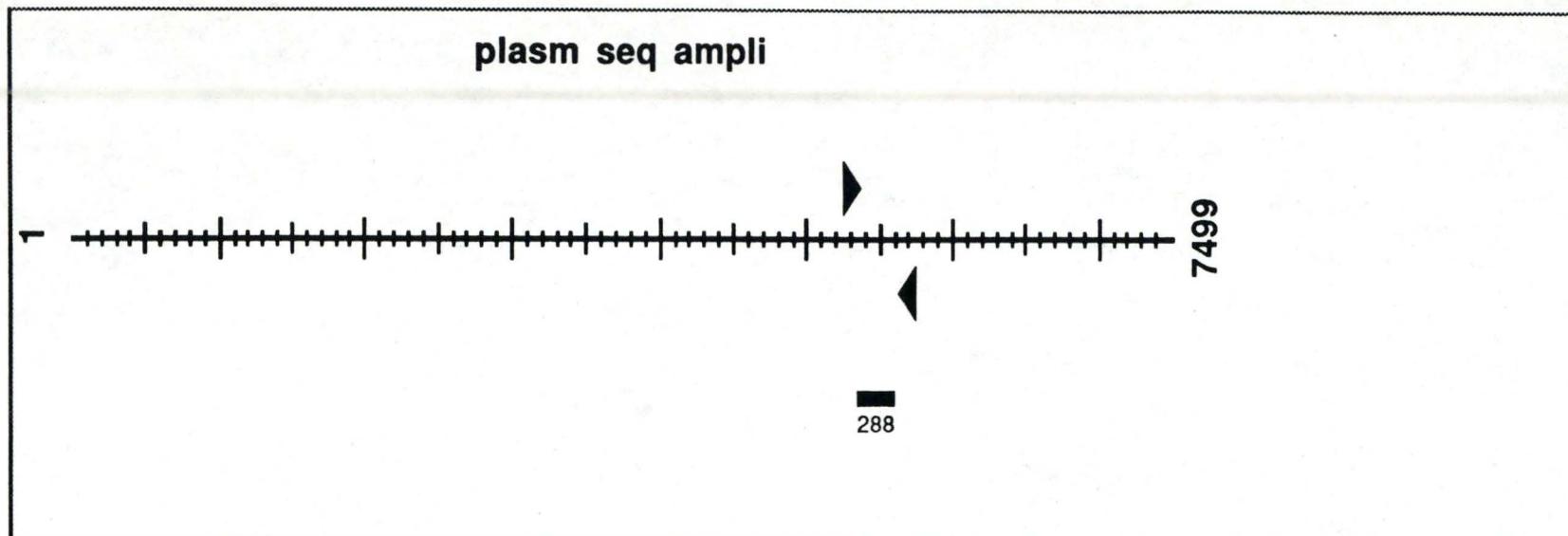


Figure n°15 : Test des primers P1 et P6 sur la séquence plasmidique de Chlamydia et sur la séquence de PBR322 par le programme Amplify. Les primers génèrent exclusivement un fragment de 288 pb comme désiré. Celui-ci servira de fragment trappeur.

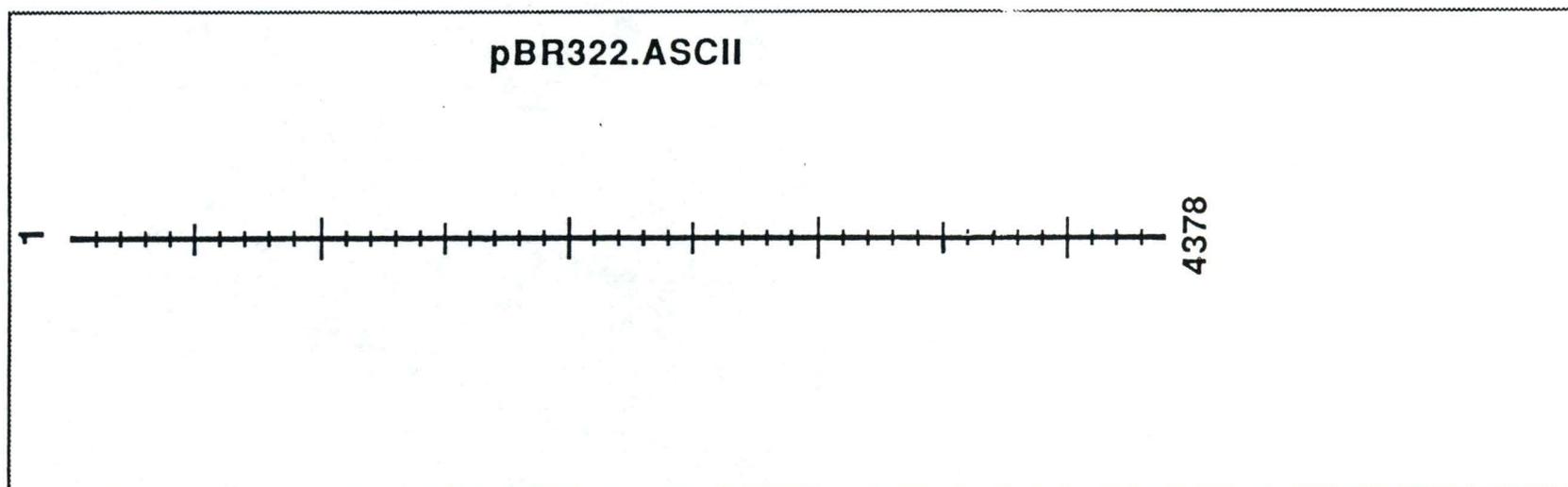
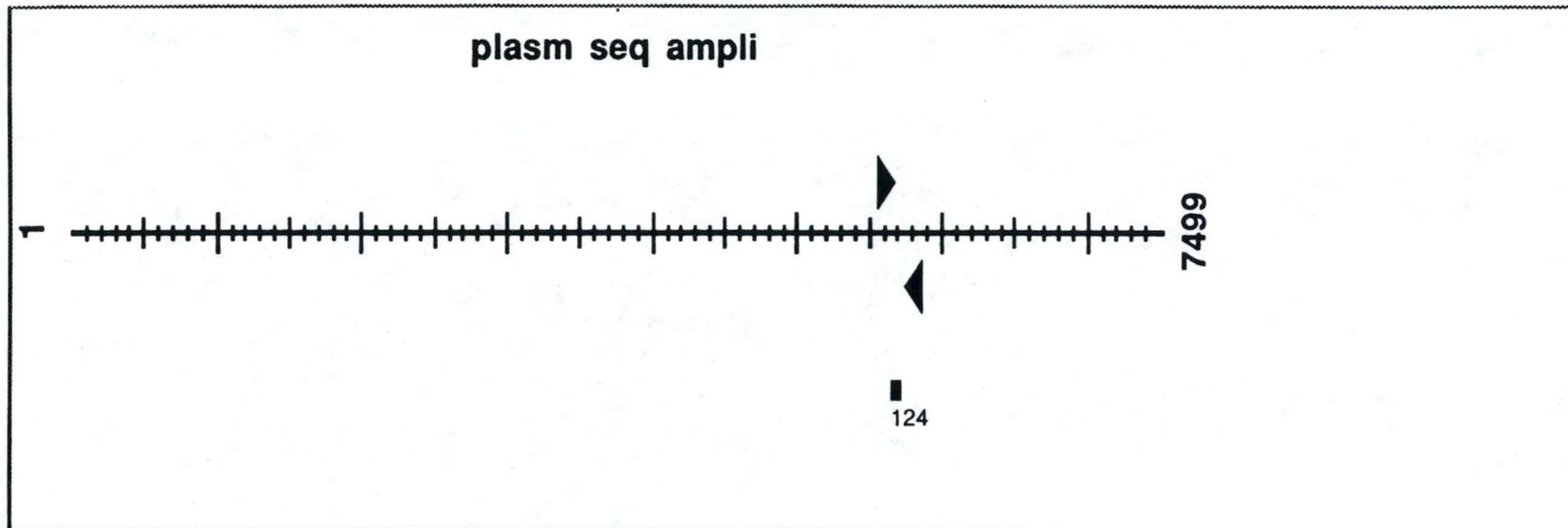


Figure n°16 : Test des primers P7 et P5 sur la séquence plasmidique de Chlamydia et sur la séquence de PBR322 par le programme Amplify. Les primers génèrent exclusivement un fragment de 124 pb comme désiré. Celui-ci servira de fragment sonde.

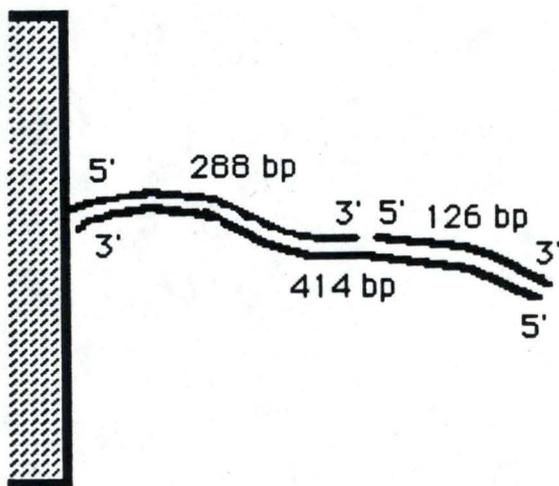


Figure n°17 : Schéma définitif de l'hybridation sandwich, avec la longueur des différents fragments amplifiés séparément par PCR

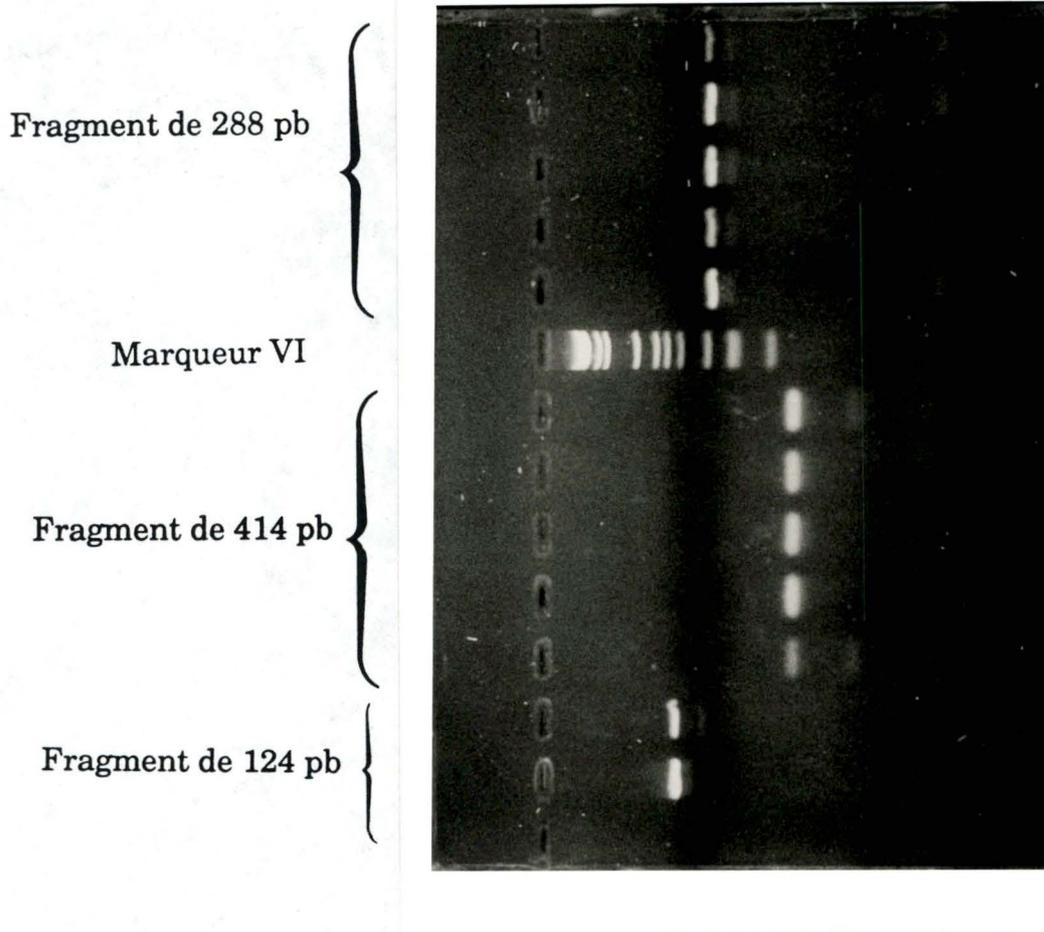


Photo n°5 : Amplification des trois types de fragments d'ADN par PCR. Le marqueur de poids moléculaire est le marqueur VI (PBR 328 digéré par BglI + PBR 328 digéré par HinfI.) donnant des bandes de 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453; 394, 298, 234, 220, 154 pb.

### III. MARQUAGE RADIOACTIF DES DIFFERENTS FRAGMENTS D'ADN

#### III.1. MARQUAGE DES FRAGMENTS NON PHOSPHORYLES

Les primers n'étant pas phosphorylés en 5', les fragments d'ADN produits par PCR ne le sont pas non plus. Le marquage radioactif de tels fragments s'effectue selon la réaction de phosphorylation décrite dans les Matériels et Méthodes.

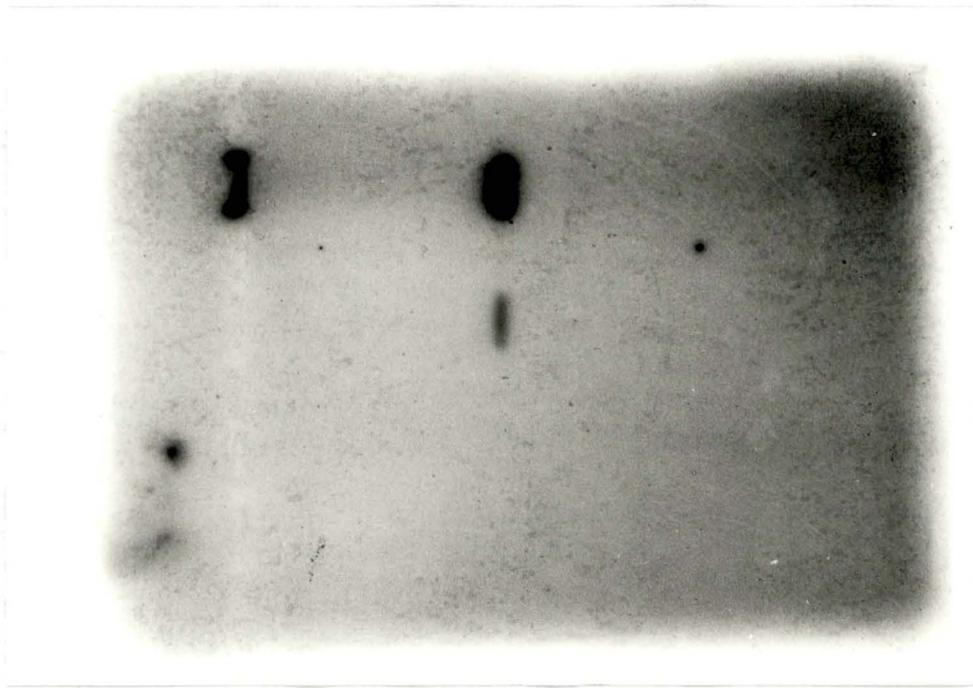
#### III.2. MARQUAGE DU FRAGMENT TRAPPEUR PHOSPHORYLE (288-P)

L'ADN trappeur devant être phosphorylé en 5' pour pouvoir être fixé par réaction covalente sur le plastic, nous avons préalablement ajouté un phosphate en 5' au fragment de 288 paires de bases. Ce morceau étant alors phosphorylé, la réaction de marquage au phosphore radioactif s'est faite dans les conditions décrites dans les Matériels et Méthodes. Après, il faut purifier les fragments d'ADN afin d'éliminer les nucléotides radioactifs non incorporés.

### IV. MISE AU POINT DE LA PURIFICATION DES DIVERSES PREPARATIONS D'ADN SUR SPIN COLONNE

Partant du protocole de purification décrit dans les Matériels et Méthodes il était nécessaire d'optimiser les conditions de purification pour chaque fragment afin - de perdre le moins possible de matériel.

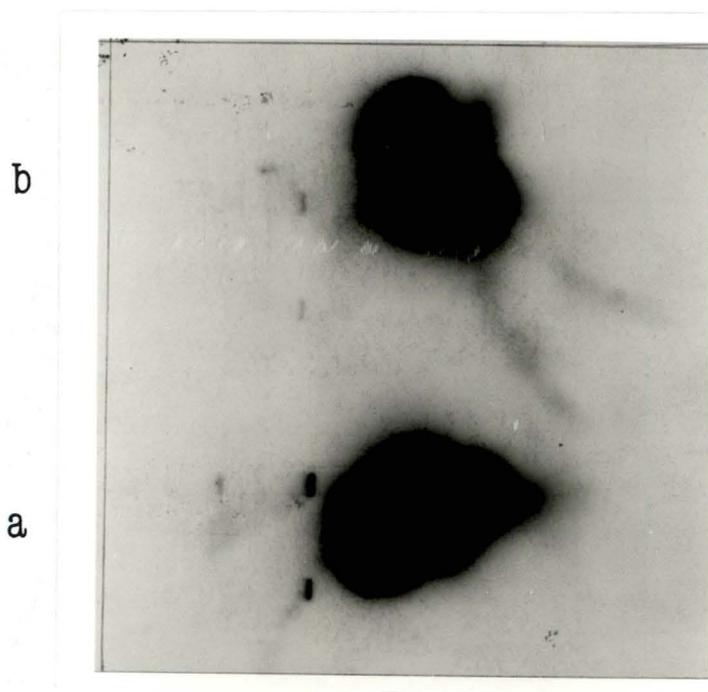
- d'être toujours sûrs de la concentration en ADN dans les solutions, indispensable pour contrôler les étapes ultérieures.



Autoradiographie n°1 : Purification du fragment de 414 pb.

1° ligne : Avant la purification, l'échantillon contient des nucléotides radioactifs non incorporés.

2° ligne : Après purification, les nucléotides non incorporés sont éliminés, mais on constate également que l'on ne récupère qu'une partie du fragment de 414 pb.



Autoradiographie n°2a : Purification du fragment de 414 pb.

1° ligne : Avant purification

2° ligne : Après purification

Autoradiographie n°2b : Purification du fragment de 600 pb (de l'ADN du virus HPV 18).

1° ligne : Avant purification

2° ligne : Après purification

#### IV.1. PURIFICATION DE L'ADN APRES MARQUAGE RADIOACTIF

Un échantillon de la solution d'ADN avant et après purification a été déposé sur un gel d'agarose pour une électrophorèse. L'ADN étant radioactif, la révélation du gel se fait par autoradiographie .

\* Autoradiographie n°1:

Il s'agit de purifier le fragment de 414 pb des nucléotides radioactifs libres. Les conditions de purification sont les suivantes : Le gel utilisé est du gel G-25 sur lequel on dépose l'échantillon et que l'on centrifuge à 2400 RPM pendant 2 minutes.

La purification est bonne puisque l'on a bien éliminé les nucléotides, mais on ne récupère qu'une partie de l'ADN.

\* Autoradiographie n°2a:

Il s'agit toujours de purifier le fragment de 414 pb des nucléotides radioactifs sur G 25 mais cette fois on procède à une centrifugation à 2400 RPM pendant 4 minutes.

Il en résulte que l'on récupère cette fois tout le fragment alors que les nucléotides ne sont toujours pas élués.

\* Autoradiographie n°2b:

Il s'agit ici de purifier un fragment de 600 pb sur gel G 25. Ce fragment de 600 pb du virus HPV18 sera utilisé comme ADN cible non spécifique (test négatif des expériences d'hybridation). On procède à une seule centrifugation de 2 minutes toujours à 2400 RPM.

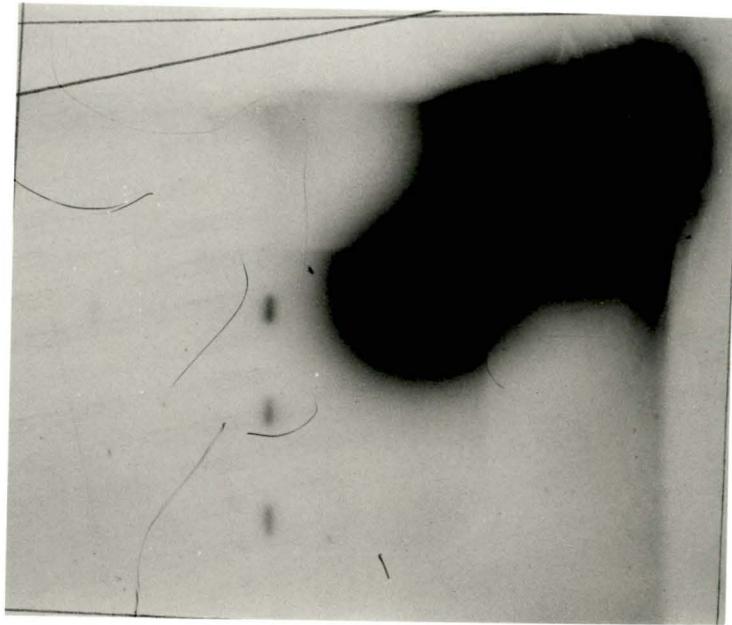
La purification est très bonne, on récupère presque tout le fragment après une centrifugation seulement; le fragment étant plus long (et donc plus lourd) que le fragment de 414 pb.

\* Autoradiographie n°3:

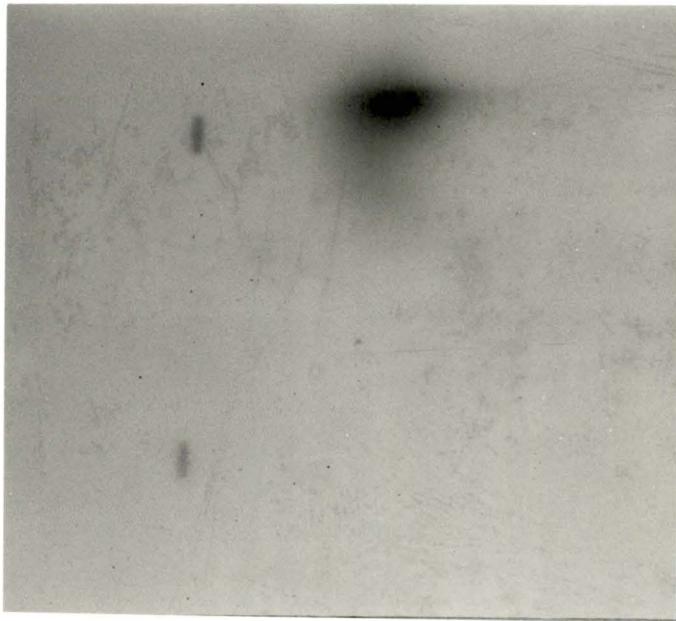
Nous voulons ici purifier le fragment de 288 pb sur G 25. Nous procédons à une première centrifugation de 2 minutes à 2400 RPM

1° centrifugation

2° centrifugation



Autoradiographie n°3 : Purification du fragment de 288 pb.  
1° ligne : Avant purification  
2° ligne : Après purification



Autoradiographie n°4 : Purification du fragment de 288 pb sur gel S-200.  
1° ligne : Avant purification  
2° ligne : Après purification

suivie d'une seconde identique après avoir pris soin de rajouter 50  $\mu$ l de tampon TE sur le gel.

Nous pouvons remarquer qu'une centrifugation suffit toujours à la purification, mais pas à la récupération de tout le fragment. Ne récupérant qu'environ 50 % du fragment à la 1<sup>o</sup> centrifugation, une 2<sup>o</sup> est nécessaire pour récupérer le reste.

\* Autoradiographie n°4:

Nous essayons toujours de purifier le fragment de 288 pb mais cette fois sur gel S 200.

Après la première centrifugation, on remet 50  $\mu$ l de tampon TE sur la colonne puis on recentrifuge une 2<sup>o</sup> fois. La solution purifiée est donc diluée deux fois.

La purification est très bonne. L'intensité de la bande après purification est environ deux fois moindre que celle avant purification indiquant une dilution 2x. Tout le fragment a donc été récupéré sans qu'e l'on détecte la présence de nucléotides radioactifs.

#### IV.2. PURIFICATION DE L'ADN APRES PCR

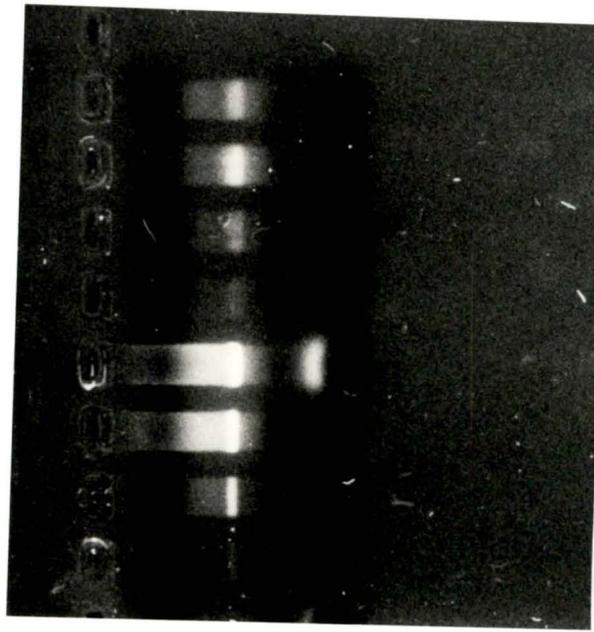
Si pour la purification de l'ADN radioactif il suffisait de séparer le fragment des nucléotides très petits, dans ce cas ci, la purification est un peu plus délicate. Il faut en effet séparer le fragment, parfois court, des primers qui eux sont de 20 à 25 pb et risquent d'être élués en même temps que le fragment.

\* Photo n°6:

Nous voulons séparer le fragment de 288 pb obtenu par PCR des primers. Nous testons pour cela deux gels S400 et S200. Nous réalisons chaque fois quatre centrifugations successives après chacune desquelles on prélève un échantillon que l'on dépose sur gel d'agarose 2%. Nous veillons à rajouter 50  $\mu$ l d'eau sur le gel avant toute nouvelle centrifugation.

Le gel S-400 donne une récupération moins bonne que le gel S-

1° centrifugation  
2° centrifugation  
3° centrifugation  
4° centrifugation  
avant purification  
1° centrifugation  
2° centrifugation  
3° centrifugation  
4° centrifugation



S-400  
S-200

288 pb primers

Photo n°6 : Mise au point de la purification d'ADN issu d'une PCR

200.

Pour ce qui est du gel S-200 les primers n'apparaissent qu'à la 4<sup>o</sup> centrifugation, alors que tout le fragment est déjà récupéré après la 2<sup>o</sup> centrifugation. Ce qui veut dire qu'on peut centrifuger au maximum 3 fois sans craindre de contamination par les primers.

Ceci est intéressant pour la purification du fragment de 124 pb qui, étant plus court, nécessite bien 3 centrifugations pour être entièrement récupéré.

### IV.3. CONCLUSION

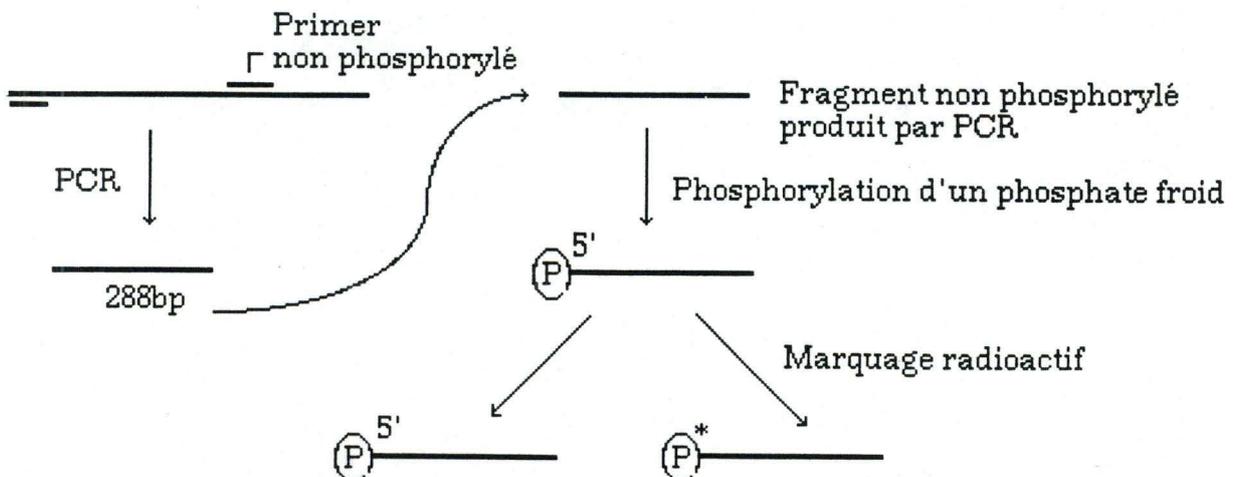
Qu'il s'agisse de purification après marquage radioactif ou après PCR, les conditions de purification adoptées sont:

- pour le fragment de 124 pb : 3 centrifugations de 2 min à 2400 RPM
- 288 pb : 2 centrifugations de 2 min à 2400 RPM
- 415 pb : 2 centrifugations de 2 min à 2400 RPM
- 600 pb : 2 centrifugations de 2 min à 2400 RPM
- (mais une seule peut suffir)

sur 1 ml de gel S-200 en ajoutant après chaque centrifugation 50  $\mu$ l d'eau (ou de TE).

## V. FIXATION DE L'ADN TRAPPEUR AUX PLAQUES COVALINK

### V.1. PHOSPHORYLATION PREALABLE DU FRAGMENT



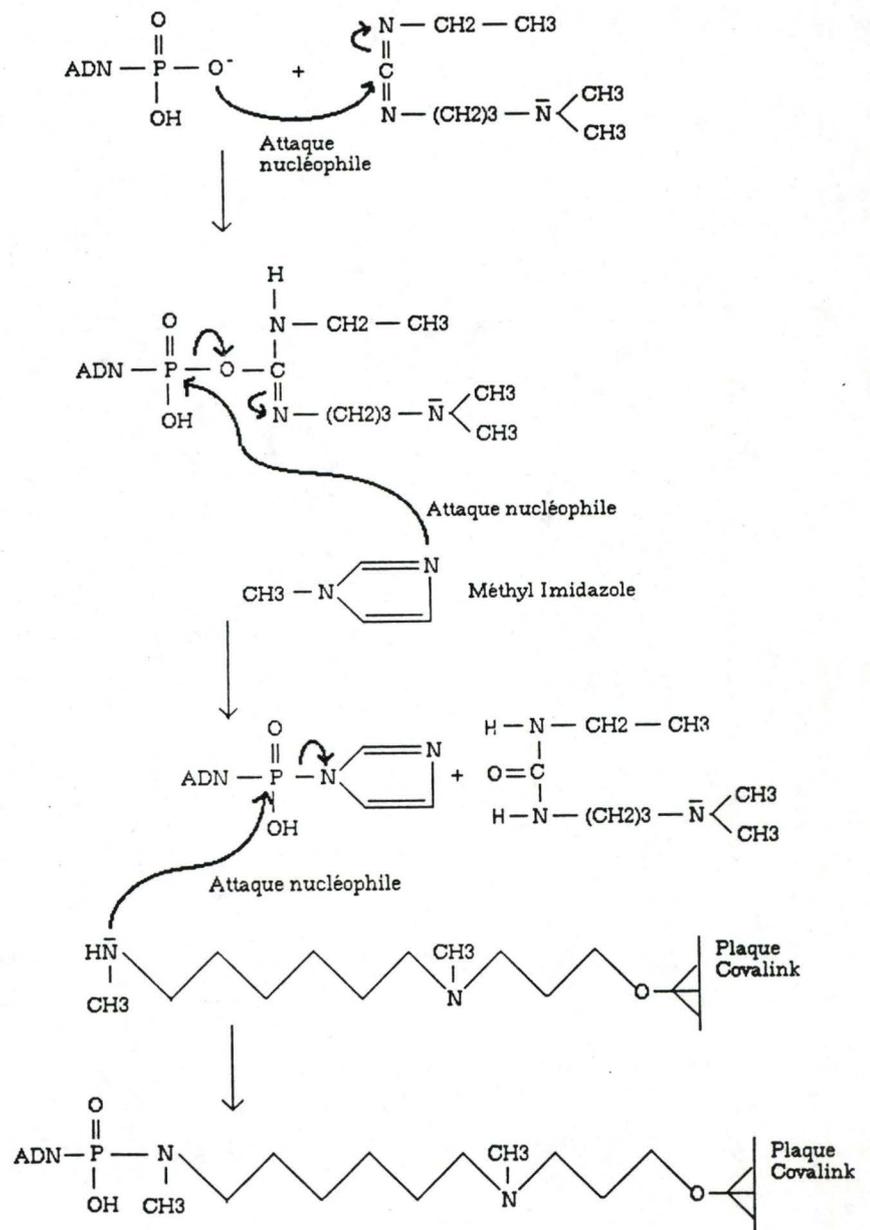


Figure n°18 : Mécanisme de la réaction de fixation du fragment d'ADN trappeur dans les puits Covalink.

Pour l'expérience de fixation de l'ADN trappeur sur le plastique, un mélange de fragment trappeur radioactif et non radioactif (froid) en proportion 1/4 sera utilisé. Ceci, afin de donner un signal radioactif assez élevé pour obtenir une bonne lecture et pas trop élevé afin de ne pas s'exposer inutilement aux radiations et par soucis d'économie.

## V.2. EXPLICATION DE LA REACTION DE FIXATION SUR LES PLAQUES COVALINK

### A. La réaction

La réaction décrite dans la brochure de la société Nunc est celle de la fixation d'un peptide aux plaques Covalink utilisant le carbodiimide (EDC) en présence de N-hydroxy-succinimide (NHS), alors que nous procédons à la fixation de l'ADN en utilisant le carbodiimide en présence de Methyl Imidazole. Quelques modifications ont donc été faites par rapport à la réaction décrite dans la brochure. Le mécanisme de la réaction est détaillé à la figure 18.

### B. Remarque concernant les fonctions amides de l'ADN

Vu la délocalisation possible du doublet de l'azote par raisonnement, les amides présentes sur les bases nucléiques sont en solution beaucoup moins réactionnelles que les amines aliphatiques. Il n'y a donc pas lieu de craindre une attaque nucléophile de l'azote des amides à la place de l'azote du Methyl Imidazole sur le phosphate de l'ADN.

## V.3. OPTIMALISATION DE LA FIXATION

### A. Courbe de concentration de l'ADN trappeur

Les conditions de fixation utilisées lors de cette première expérience, sont celles du protocole initial (décrit dans les Matériels et Méthodes), mis à part la solution stock d'ADN qui est contenue dans du TE et non dans de l'eau.

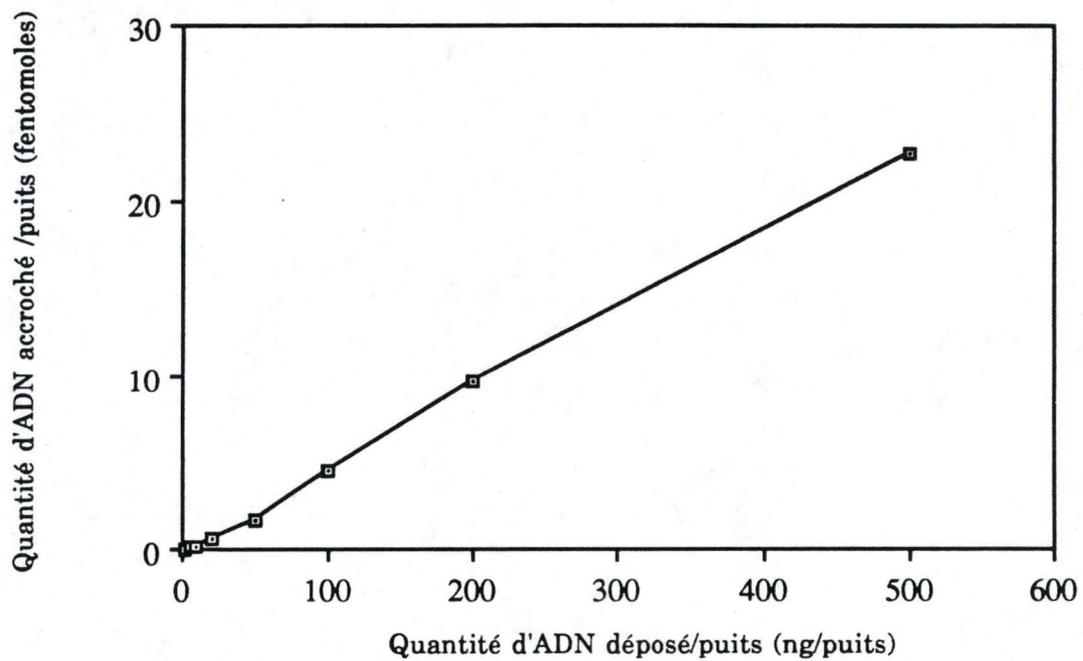


Figure n°19 : Courbe de concentration en ADN trappeur.  
Quantité de fragment trappeur fixé aux plaques Covalink  
(fm/puits) en fonction de sa concentration de départ (ng/puits).

La solution de lavage utilisée est celle du protocole initial, seule la méthode diffère:

- ° recueillir les surnageants dans des fioles à comptage radioactif
- ° 1° lavage: 150 µl de solution de lavage (à 50°C) par puits pendant 5 minutes
- ° récupérer ces 150 µl dans des fioles à comptage
- ° procéder de même pour le 2° lavage
- ° placer chaque puits dans une fiole avec 4 ml de liquide scintillant.

En récupérant ainsi chaque fraction (surnageant, 1° et 2° lavages, puits) nous pouvons connaître la proportion d'ADN fixé et non fixé, décroché par le 1° et le 2° lavage. Dorénavant, nous procéderons toujours de cette manière.

Rasmussen *et al.* (1991) ont montré qu'ils fixent au maximum 60 fm d'ADN par puits. Nous n'en fixons que 23 fm par puits avec la concentration de départ la plus élevée (500 ng d'ADN/puits). Les pourcentages d'ADN fixé par rapport à l'ADN de départ sont extrêmement faibles (fig.19). La concentration pour laquelle on obtient le pourcentage le plus élevé est 200 ng/puits. Dès lors nous utiliserons cette concentration pour les autres essais.

#### B. Essais de différentes températures et solutions de lavage

La température pouvant intervenir plus ou moins favorablement dans toute réaction, nous en avons testé deux à savoir 65°C et 50°C.

Les solutions de lavage utilisées sont:

NaOH 0,4N + SDS 0,25 %

NaOH 0,2N + SDS 0,25 %

SSC 5X + SDS 0,25 %

EAU + SDS 0,25 %

La température de 65°C est plus défavorable que 50°C car la quantité d'ADN fixée est plus faible (fig.20). A 50°C, vu la stringence des lavages au NaOH, on peut penser que les 20 femtomoles d'ADN restant après ces lavages au NaOH sont bien fixés de manière covalente (fig.21). Cela signifie que des 80 fm d'ADN restant dans les puits après lavage au SSC 5X, une grande partie (60 fm) ne serait pas liée de manière covalente. Nous continuerons donc à laver avec des lavages de stringence élevée et à améliorer la réaction de fixation.

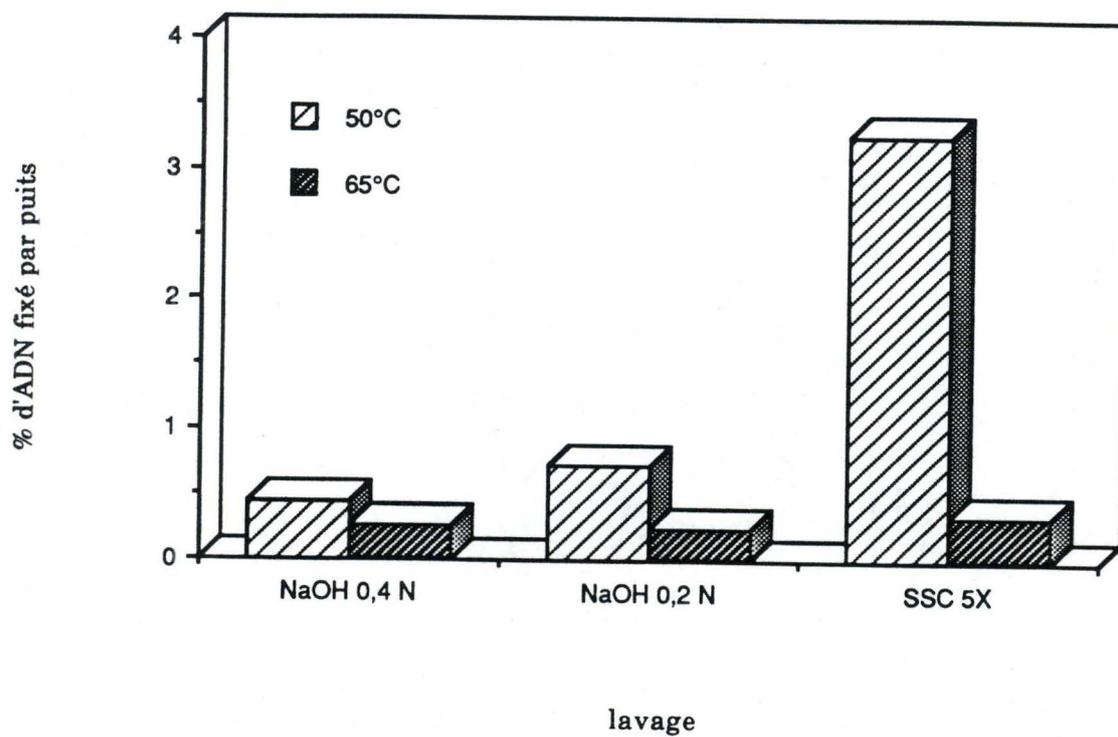


Figure n°20 : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink à 65°C et 55°C en fonction des lavages .  
Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples.

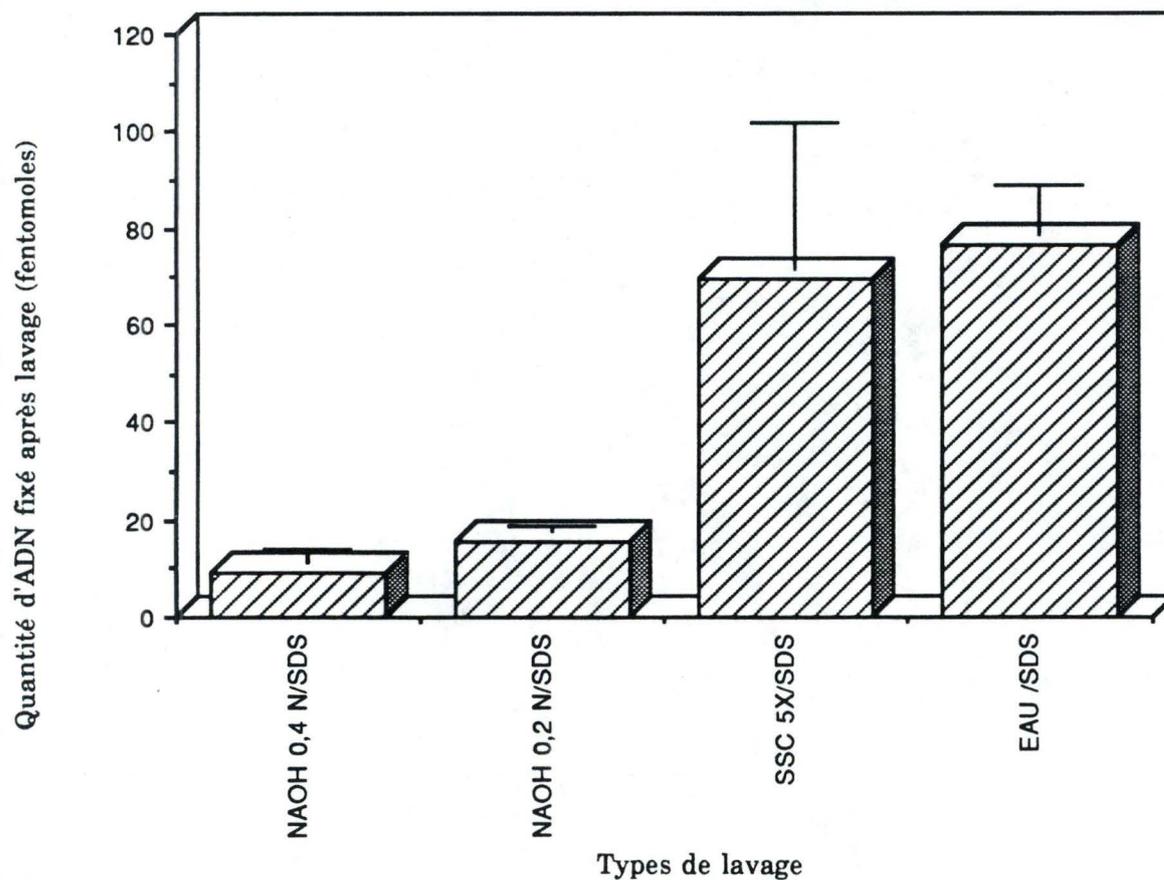


Figure n°21 : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink à 50°C en fonction du type de lavage.  
Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

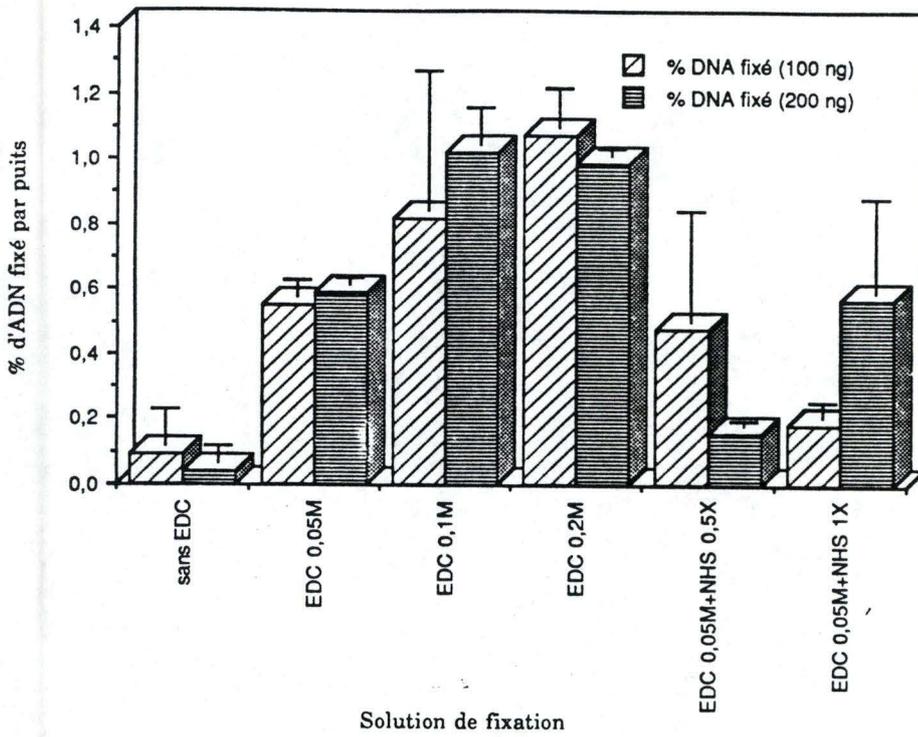


Figure n°22a : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink en fonction de la concentration en EDC et NHS. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

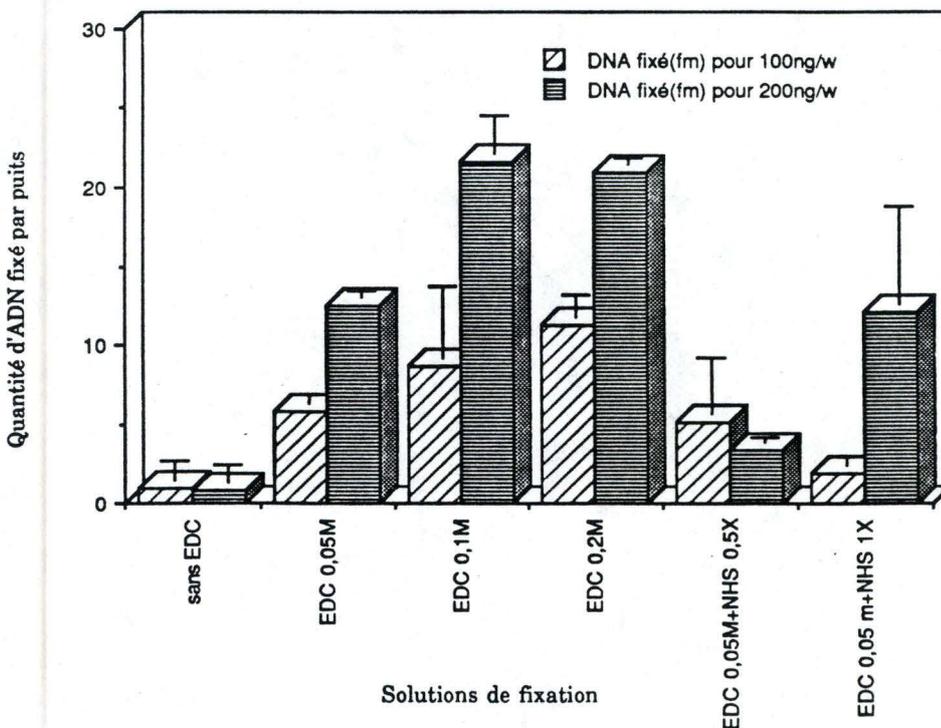


Figure n°22b : Quantité d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink en fonction de la concentration en EDC et NHS. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

### C. Essais avec le NHS et de différentes concentrations d'EDC

Dans le but d'améliorer la fixation, nous avons réalisé quelques expériences en ajoutant du N-hydroxysuccinimide (NHS) en plus du Methyl Imidazole (MeIm), car il pourrait intervenir favorablement dans la réaction comme décrit dans la brochure de Rasmussen. Dans celle-ci, il était renseigné d'utiliser 1,84 ng de NHS (Pierce n°2450) pour 12,3 mg d'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide). Pour un puits contenant une solution d'EDC 0,05M, nous avons ajouté 0,57 ng/100µl de NHS (ce que nous appelons NHS 1X).

De plus, nous avons testé deux concentrations d'EDC plus hautes (0,1M et 0,2M) par rapport à la concentration initiale (0,05M).

- Solutions de lavage: 1° lavage: SSC 5X + SDS 0,25 %

2° lavage: NaOH 0,2N + SDS 0,25 %

(solutions toujours préparées fraîchement et chauffées à température d'hybridation: 50°C)

- Les résultats sont présentés à la figure 22a et 22b.

Le NHS n'améliore pas la fixation, au contraire, il donne des rendements de fixation plus bas.

La concentration d'EDC par contre semble être un facteur beaucoup plus important que la présence ou l'absence de NHS.

Le test avec EDC 0,2M et 100 ng d'ADN par puits donne le meilleur rendement.

Mais quoi qu'il en soit, même dans ces conditions, le pourcentage d'ADN fixé reste très faible. La figure 23 montre que si la quantité d'ADN restant dans les puits est si faible, ce n'est pas à cause des lavages, car ils décrochent des quantités normales d'ADN, mais bien à cause d'une réaction de fixation qui se fait toujours très mal vu les quantités d'ADN importantes recueillies dans les surnageants.

### D. Etude du pH de la réaction

Le Methyl Imidazole (MeIm) est le dernier paramètre encore inchangé. Des solutions de MeIm de deux concentrations et de pH différents ont été testées.

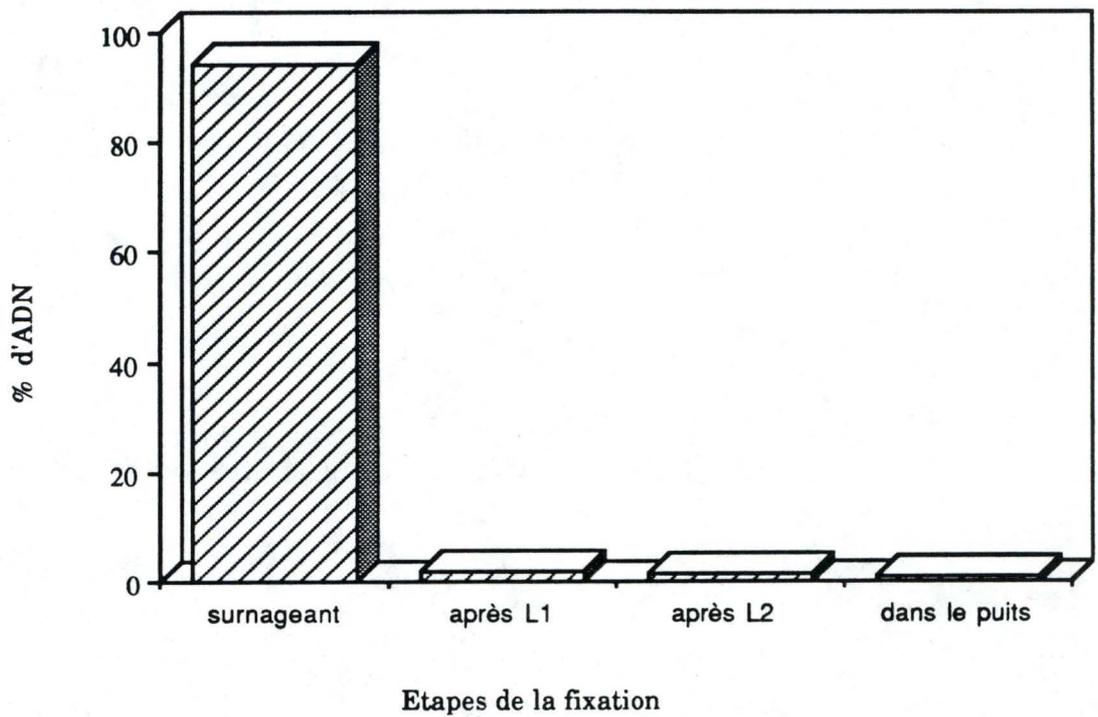


Figure n°23 : Répartition de l'ADN trappeur dans les différentes fractions. L'expérience est réalisée avec 100 ng d'ADN trappeur/puits et une concentration en EDC de 0,2 M.  
 L1 = 1° lavage : SSC 5X - SDS 0,25%  
 L2 = 2° lavage : NaOH 0,2 N - SDS 0,25%  
 Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples

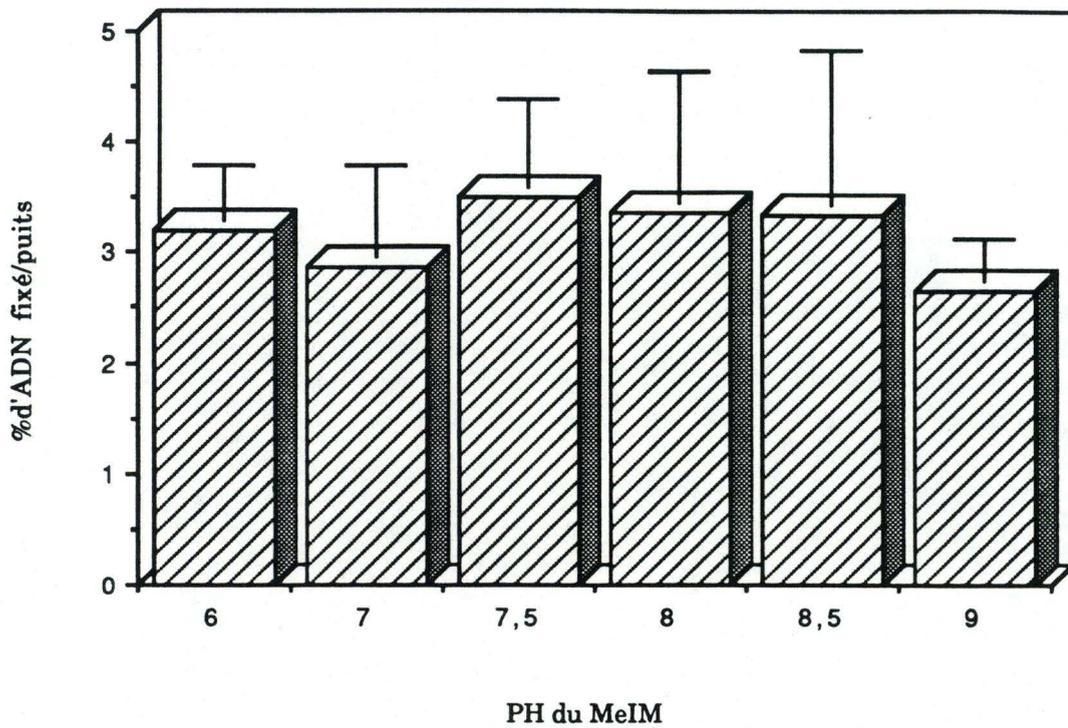


Figure n°24a : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink en fonction du pH du MeIm 0,1 M. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

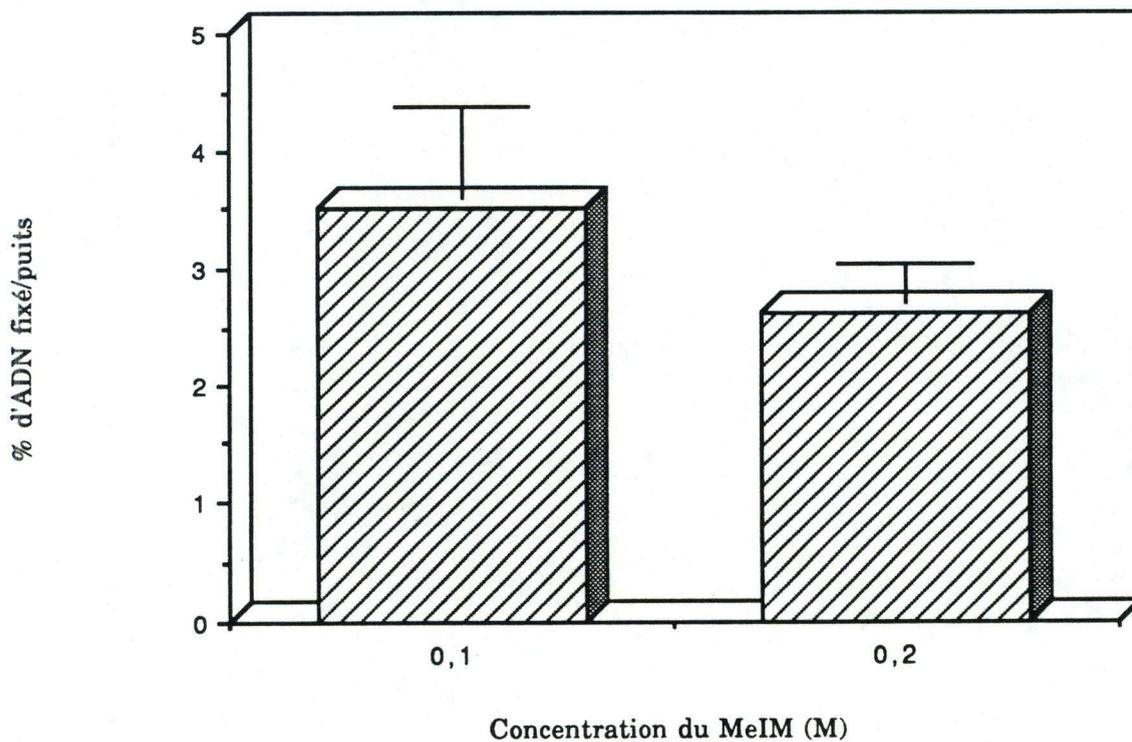


Figure n°24b : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink en fonction de la concentration du MeIm à pH 7,5. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Le pH peut avoir un rôle important dans cette réaction. En effet, l'amine tertiaire du MeIm ainsi que l'amine secondaire de la plaque Covalink sont des bases et donc sujettes à une protonation.

Or, si les amines se protonent, elles ne seront plus aptes à l'attaque nucléophile sur le phosphate. D'où la nécessité de préserver la forme non protonée des amines et pour cela travailler en milieu assez basique pour éviter leur protonation; il faut cependant éviter un milieu trop basique qui casserait les liens phosphates de l'ADN.

° Les conditions changées par rapport à l'expérience précédente sont:

- le pH du MeIm que l'on fait varier de 6 à 9,
- une concentration de MeIm de 0,2M encore jamais testée (la concentration initiale étant de 0,1M),
- un seul lavage au NaOH 0,2N à température ambiante cette fois.

° D'après les résultats montrés figure 24a et 24b, on peut déduire les conclusions suivantes :

- les pourcentages de fixation sont plus élevés que dans les expériences précédentes. Ceci s'explique en partie par le fait qu'on ne procède qu'à un seul lavage.
- que la concentration de MeIm 0,2M est plus défavorable à la réaction. Nous gardons dès lors la concentration initiale de 0,1M.
- qu'une variation de pH entre 7,5 et 8,5 n'a pas beaucoup d'importance mais qu'un pH trop acide (6) ou trop basique (9) est moins favorable. Nous retenons comme pH idéal de réaction un pH de 7,5.

#### E. Etude des lavages

L'expérience précédente montrant une légère amélioration grâce à de nouvelles conditions de lavage, nous avons testé cette fois une solution de lavage de NaOH 0,2N à 4°C. Le NaOH glacé éviterait ainsi un effet dénaturant qu'aurait le NaOH chauffé sur l'ADN.

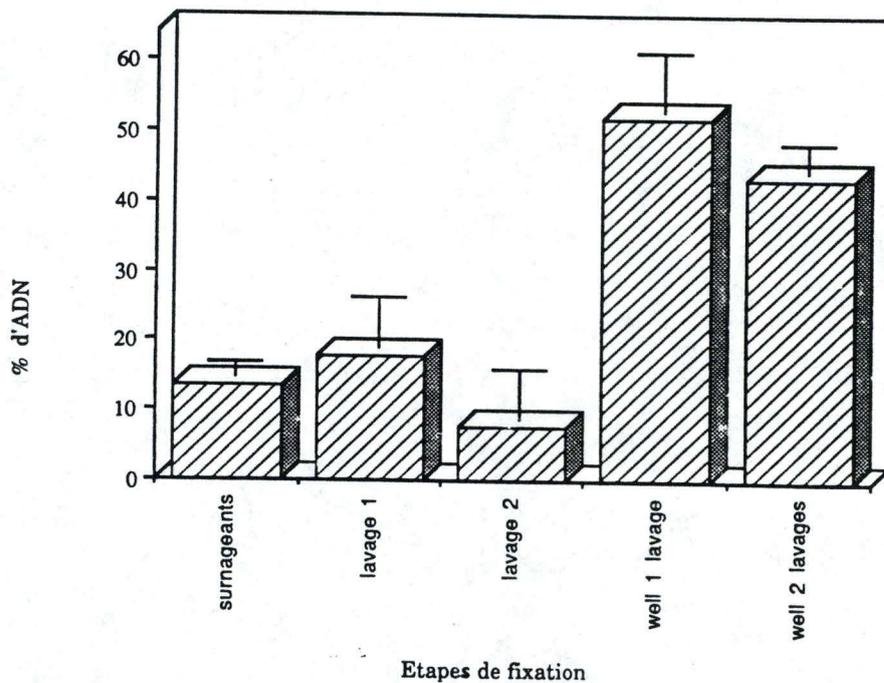


Figure n°25a : Répartition des 100 ng d'ADN/puits dans les différentes fractions: surnageants, 1° lavage ,2° lavage, puits ayant subi 1 lavage, puits ayant subi 2 lavages. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm$  2s (écart type).

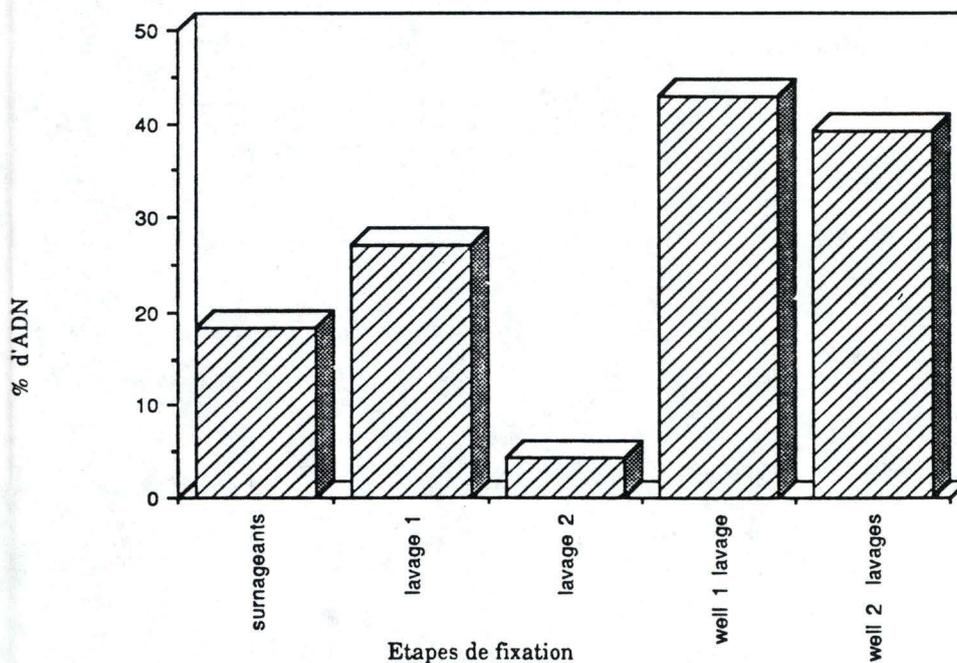


Figure n°25b : Répartition des 200 ng d'ADN/puits dans les différentes fractions: surnageants, 1° lavage, 2° lavage, puits ayant subi 1 lavage, puits ayant subi 2 lavages. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples

En procédant pour certains puits à un seul lavage et d'autres à deux lavages, il est possible de comparer les effets de l'un et de l'autre distinctement. Les conditions de fixation adoptées dans cette expérience sont:

- 100 ou 200 ng d'ADN/puits
- EDC 0,2M
- Methyl Imidazol (MeIm) 0,1M PH 7,5
- ADN purifié dans les conditions optimales (sur S-200) et récupéré dans de l'eau après purification.

Les résultats sont présentés aux figures 25a et 25b.

Le pourcentage d'ADN fixé est partout beaucoup plus élevé que dans les expériences précédentes. Or la grande différence est la purification sur S-200 qui nous permet de connaître plus exactement la concentration en ADN des solutions et de remplacer le TE par de l'eau.

#### F. Importance de la purification

Voyant l'importance de la purification, nous avons comparé trois expériences différentes à savoir une première où l'ADN est purifié sur S-200 et récupéré dans du TE, une deuxième où il est également purifié sur S-200 mais récupéré dans de l'eau et une dernière où il est purifié sur G25 préparé en présence de TE. Les autres conditions sont les suivantes :

- 100 ng d'ADN/puits
- EDC 0,2M dissout dans du MeIm 10mM à 4°C
- MeIm 0,1M PH 7,5
- 5 heures à 50°C
- lavages: 2 X 200 µl de NaOH 0,2N à 4°C pendant 5 minutes
- Résultats : (figure 26)

La purification sur S-200 est nettement favorable à la réaction de fixation. De plus, le fait que l'ADN soit récupéré dans l'eau augmente le rendement de fixation de cet ADN trappeur sur le plastique. Le tampon TE est donc une des causes du mauvais fonctionnement de la réaction de fixation.

Le TE étant composé de Tris, son effet inhibiteur sur le processus de fixation pourrait être causé par la fonction aminée du Tris qui interférerait avec l'EDC

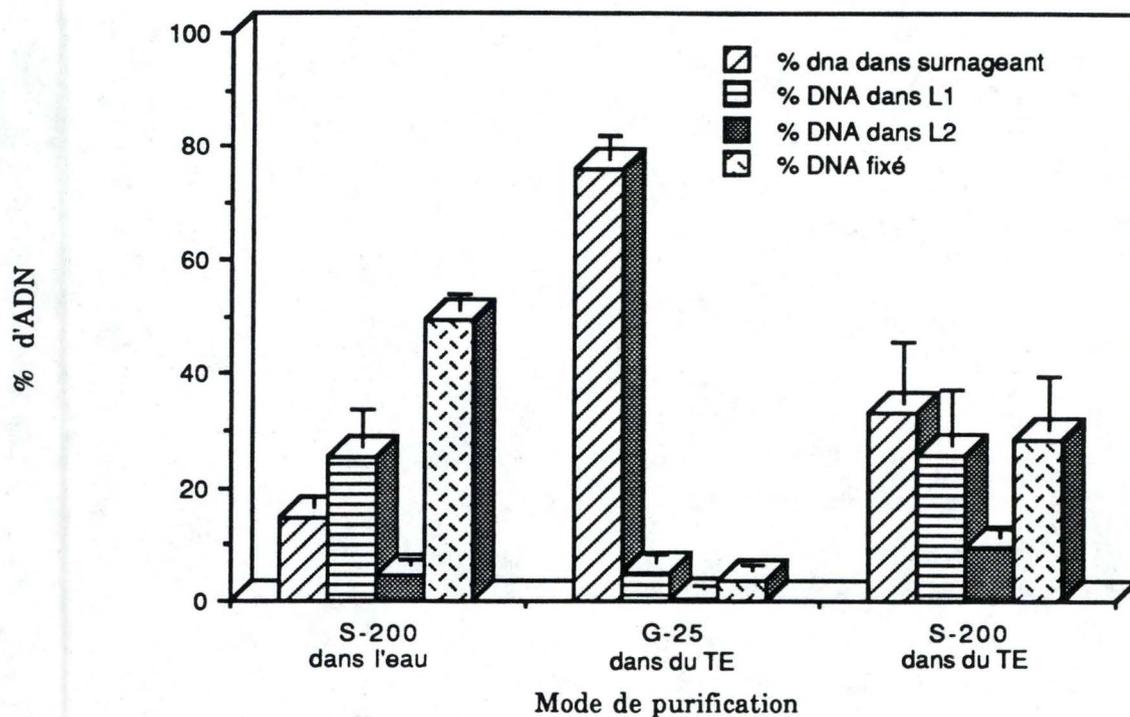


Figure n°26 : Pourcentage d'ADN trappeur dans les différentes fractions en fonction du mode de purification de l'ADN : le type de gel utilisé (S-200 ou G-25) et la solution dans laquelle est récupéré l'ADN après purification (eau ou TE). Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

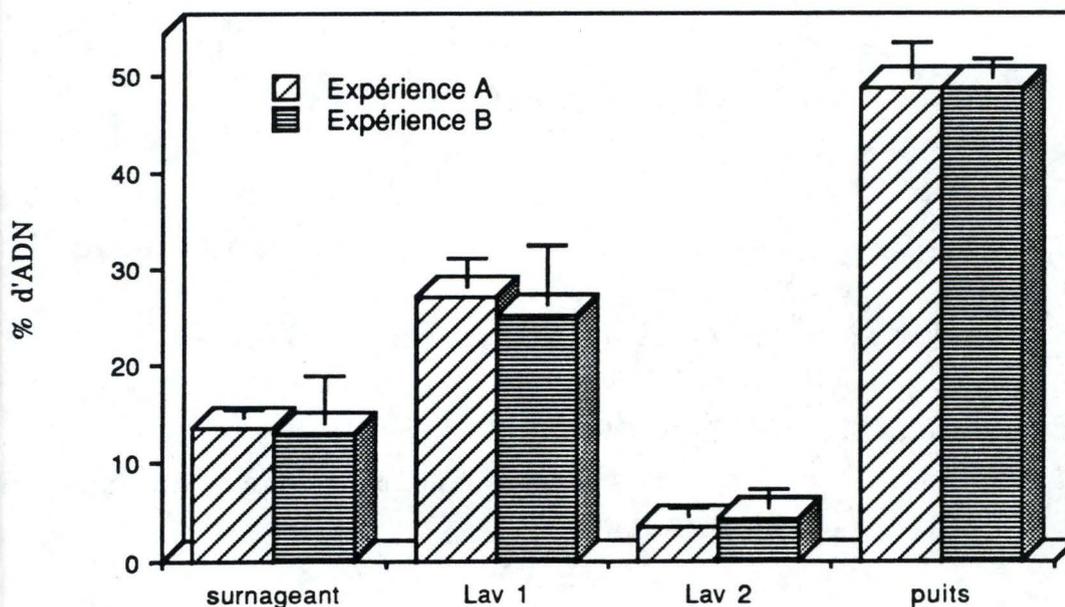


Figure n°27 : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink pour deux expériences (A et B) réalisées dans les conditions mises au point. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

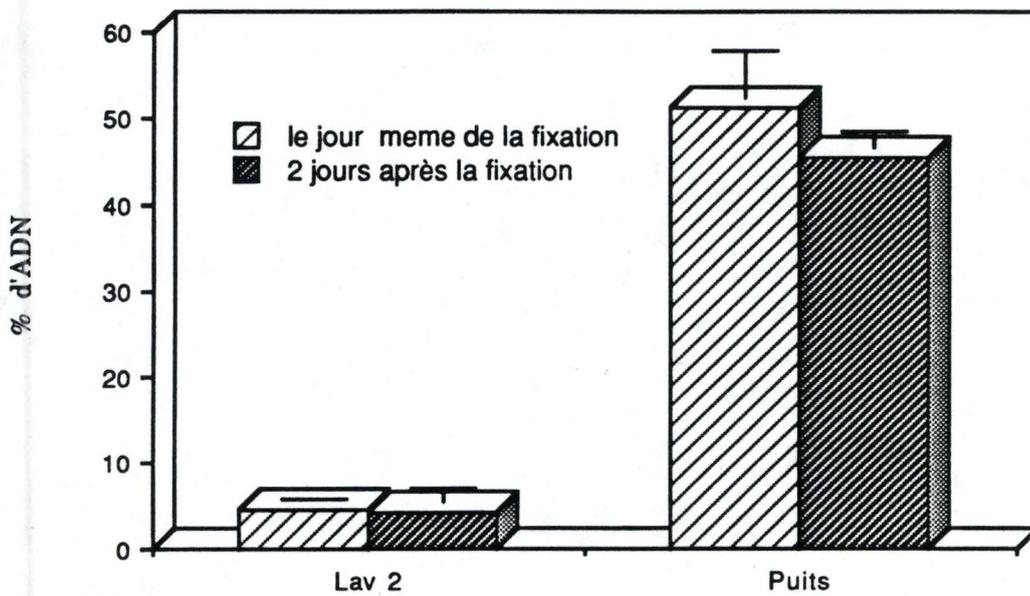


Figure n°28 : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink le jour même de la fixation et pourcentage d'ADN trappeur fixé restant 2 jours après la fixation. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

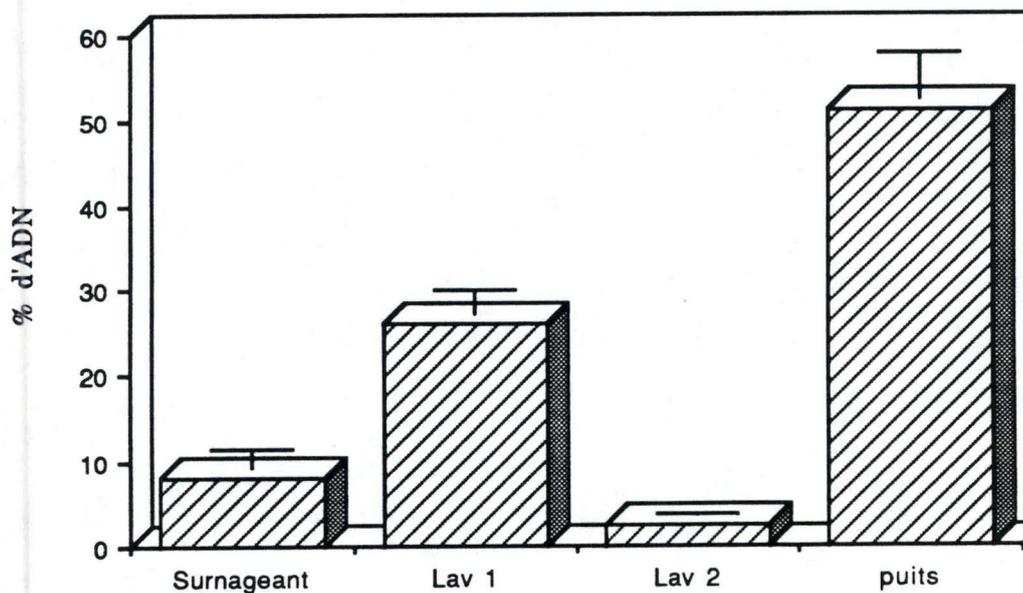


Figure n°29 : Pourcentage d'ADN trappeur fixé aux plaques Covalink dans les conditions mises au point. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Afin d'être sûr de la bonne reproductibilité de nos résultats, deux autres expériences de fixation ont été réalisées (fig.27). Elles confirment une fixation qui se situe près de 50 % de l'ADN de départ.

#### G. Conservation des puits coatés

Les conditions optimales de fixation maintenant déterminées, nous allons pouvoir procéder à des expériences de fixation de dizaines de puits à la fois. Cela veut dire que certains puits "coatés" ne seront pas utilisés avant 2 ou 3 jours. Il était donc intéressant, avant de nous lancer dans des expériences de fixation d'un grand nombre de puits, de voir comment résiste le lien covalent de la fixation aux rinçages, séchage et stockage des boîtes Covalink.

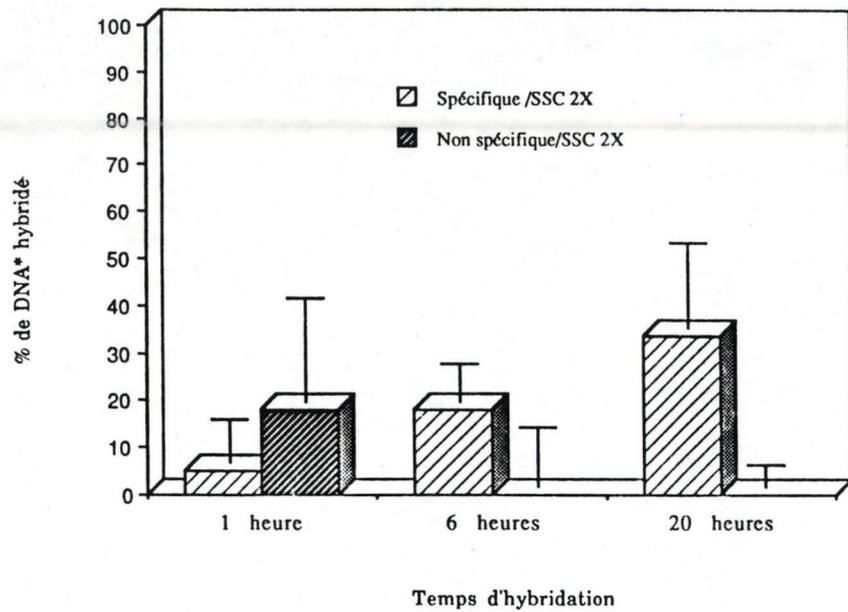
- Une expérience de fixation est réalisée et la radioactivité présente dans les puits est déterminée le jour même de la fixation ou 2 jours après.
  - Les conditions de stockage sont:
    - ° un seul des deux lavages après la fixation
    - ° un rinçage à l'eau
    - ° séchage à 45°C pendant 10 à 15 minutes
    - ° conservation à 4°C recouvert d'un autocollant plastique
    - ° 2° lavage avant le comptage
  - Les résultats sont présentés figure 28.
- On observe une légère perte d'ADN (5 %) après deux jours, mais elle n'est pas conséquente.

Le graphe 29 montre le pourcentage d'ADN fixé dans les conditions mises au point.

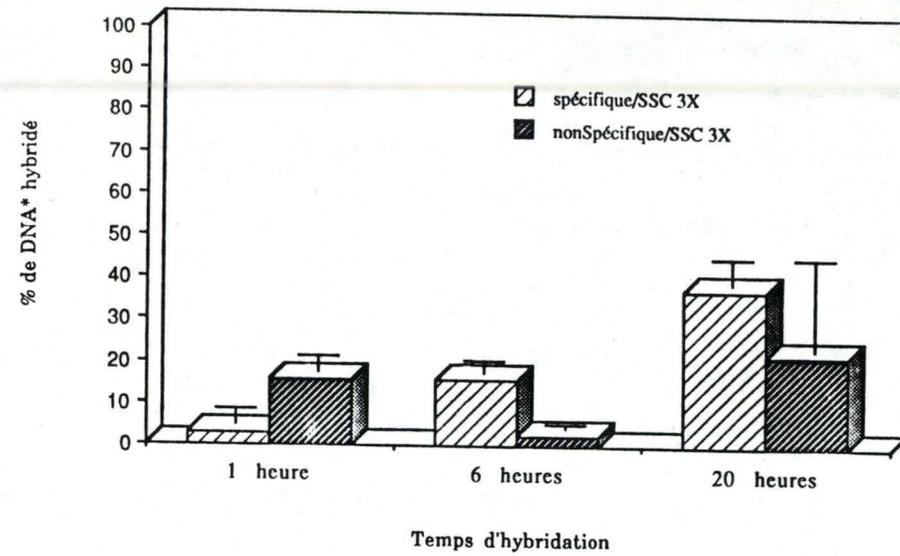
La figure 30 récapitule les conditions de fixation mises au point.

	Fixation sur Covalink
pb	288 -P en 5'
[ ]	100 ng/puits = 1058 fentomoles
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 fentomoles
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C

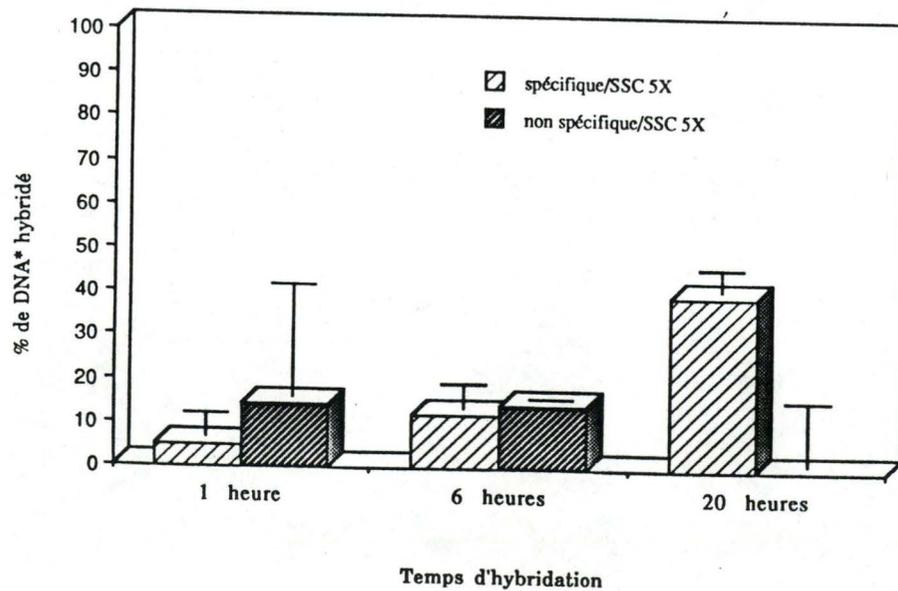
Figure n°30 : Tableau récapitulatif des conditions optimales de fixation de l'ADN trappeur aux plaques Covalink.



a



b



c

Figure n°31a : Hybridation de l'ADN cible au trappeur dans une solution d'hybridation contenant du SSC 2X en fonction du temps d'incubation. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Figure n°31b : Hybridation de l'ADN cible au trappeur dans une solution d'hybridation contenant du SSC 3X en fonction du temps d'incubation. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Figure n°31c : Hybridation de l'ADN cible au trappeur dans une solution d'hybridation contenant du SSC 5X en fonction du temps d'incubation. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

## VI HYBRIDATION SIMPLE (414pb SUR 288 pb.)

Après avoir défini les conditions optimales de fixation de l'ADN trappeur aux plaques Covalink, nous passons à l'étape ultérieure du travail qui est l'hybridation de l'ADN cible au trappeur fixé aux puits Covalink.

### VI.1. MISE AU POINT DES CONDITIONS OPTIMALES

Dans le but de mettre au point les conditions optimales de cette hybridation, nous avons procédé à des tests utilisant l'ADN cible marqué radioactivement au P<sup>32</sup>.

#### A. Etude de la durée de l'incubation et essais de différentes stringences d'hybridation.

Les durées d'incubation testées sont de 1, 6 et 20 heures. Les solutions d'hybridation de stringences différentes sont réalisées avec du SSC 5X, 3X et 2X (plus la concentration en SSC est faible, plus la stringence est élevée).

Pour le reste, le protocole suivi est le protocole d'hybridation simple décrit dans les Matériels et Méthodes. mis à part la solution de lavage qui ne contient pas de SDS. La température d'hybridation est de 42°C (température couramment utilisée pour l'hybridation).

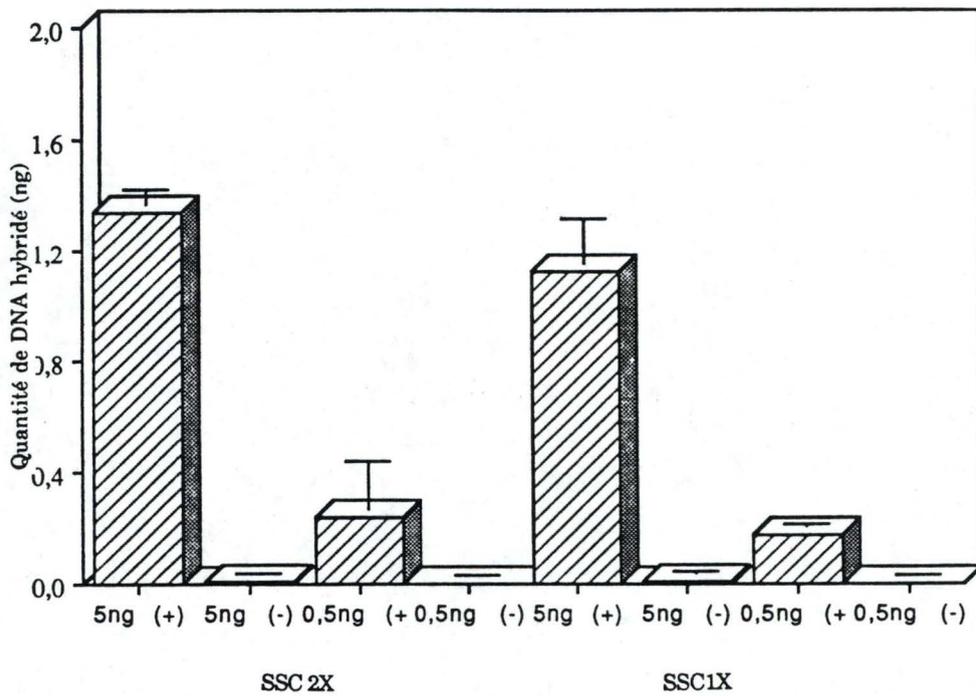
Nous procédons toujours à des tests négatifs, c'est à dire, des tests dans les quels l'ADN cible n'est pas *Chlamydia trachomatis*.. Ces tests ci ont pour contrôle non spécifique un fragment de 600 pb d'HPV 18 (papillomavirus)

Résultats :

\* Les résultats concernant la durée d'incubation sont présentés aux figures 31a, 31b, 31c.

Il semble que de longues durées soient plus favorables à l'hybridation spécifique. En effet, pour l'ADN spécifique, l'hybride une fois formé ne se dissociera plus vu l'homologie de séquences totale. C'est ainsi qu'une durée d'hybridation plus longue ne peut que donner d'avantage d'occasions aux deux partenaires de se rencontrer. Par contre, pour l'ADN non spécifique, l'hybride n'est pas stable. Il peut se défaire donnant ainsi l'occasion à l'ADN spécifique de prendre sa place et de former un hybride stable qui, lui, ne se défera plus.

A



B

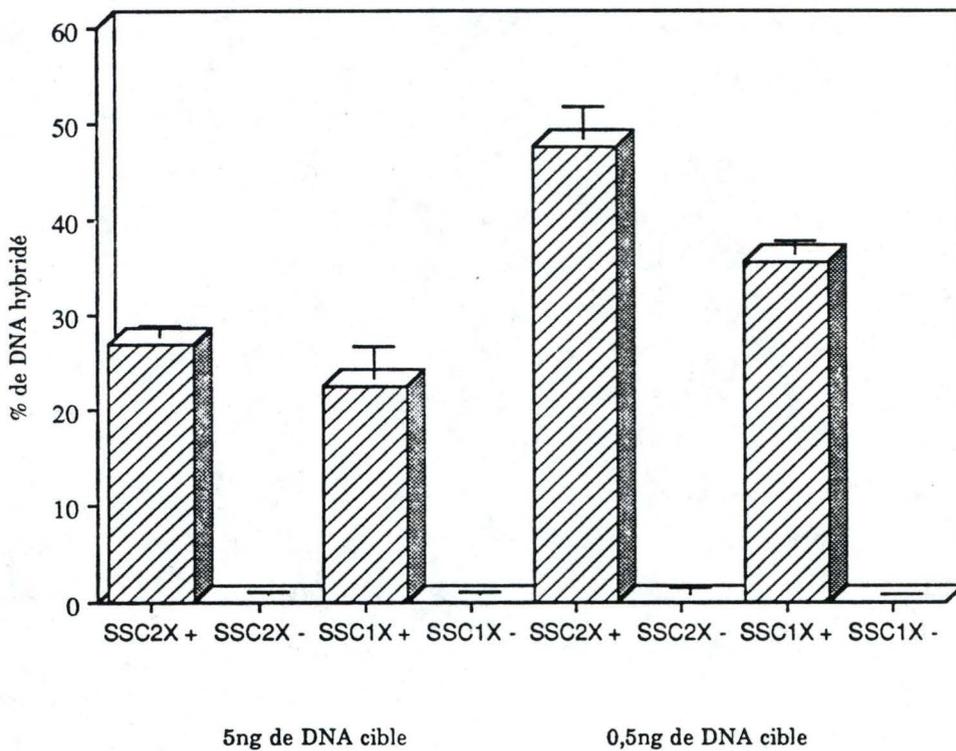


Figure n°32a : Pourcentage d'ADN cible hybridé au trappeur pour deux concentrations d'ADN cible (5 ng/puits et 0,5 ng/puits) et dans deux milieux d'hybridation de stringence différente (SSC 1X et SSC 2X).

+ = Test positif avec l'ADN spécifique (*Chlamydia*)

- = Test négatif avec l'ADN non spécifique (PCHP1: ADN de hamster de souche CHR30).

Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Figure n°32b : Quantité d'ADN cible hybridée au trappeur (ng/puits) pour deux concentrations d'ADN cible (5 ng/puits et 0,5 ng/puits) et dans deux milieux d'hybridation de stringence différente (SSC 1X et SSC 2X).

+ = Test positif avec l'ADN spécifique (*Chlamydia*)

- = Test négatif avec l'ADN non spécifique (PCHP1: ADN de hamster de souche CHR30).

Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Il est bien entendu qu'après 20 heures la vitesse d'hybridation spécifique est beaucoup plus lente (vu que les quantités d'ADN cible encore libre diminuent) mais au total, l'accumulation de l'hybridation pendant les 20 heures donne un pourcentage d'ADN hybridé élevé.

\* L'influence de la stringence:

Pour l'hybridation spécifique, la différence de stringence a peu d'effet car l'hybride est fort stable. On obtient pratiquement le même pourcentage de fixation dans les 3 milieux utilisés. On pourra certainement tester des solutions de stringence plus élevées.

Par contre, la stringence a plus d'effet sur l'hybride non spécifique peu stable.

### Conclusion:

Des temps d'hybridation longs ainsi que des stringences plus élevées sont favorables à l'hybridation spécifique.

### B. Essais de solutions d'hybridation plus stringentes

Les conditions d'hybridation sont :

- 42°C pendant 20 heures
- solutions d'hybridation avec SSC 1X et SSC 2X
- quantité d'ADN cible: 5 ng = 26 fm (comme précédemment) et 0,5 ng = 2,6 fm

Remarque: Dorénavant les contrôles négatifs seront réalisés avec un fragment de 561 pb d'ADN de PCHP1 (ADN de hamster de souche CHR30)

Les résultats sont montrés aux figures 32a et 32b.

- A des temps d'incubation de 20 heures et en présence de SSC 1X et 2X, nous n'observons quasiment aucune hybridation non spécifique. La stringence de ces milieux est suffisante pour éviter l'hybridation non désirée. Dans le cas de l'hybridation spécifique, le rendement est légèrement diminué avec le SSC1X. On atteint probablement une limite.

- Que ce soit avec le SSC1X ou le SSC 2X, de meilleurs rendements sont obtenus avec 0,5 ng d'ADN cible.

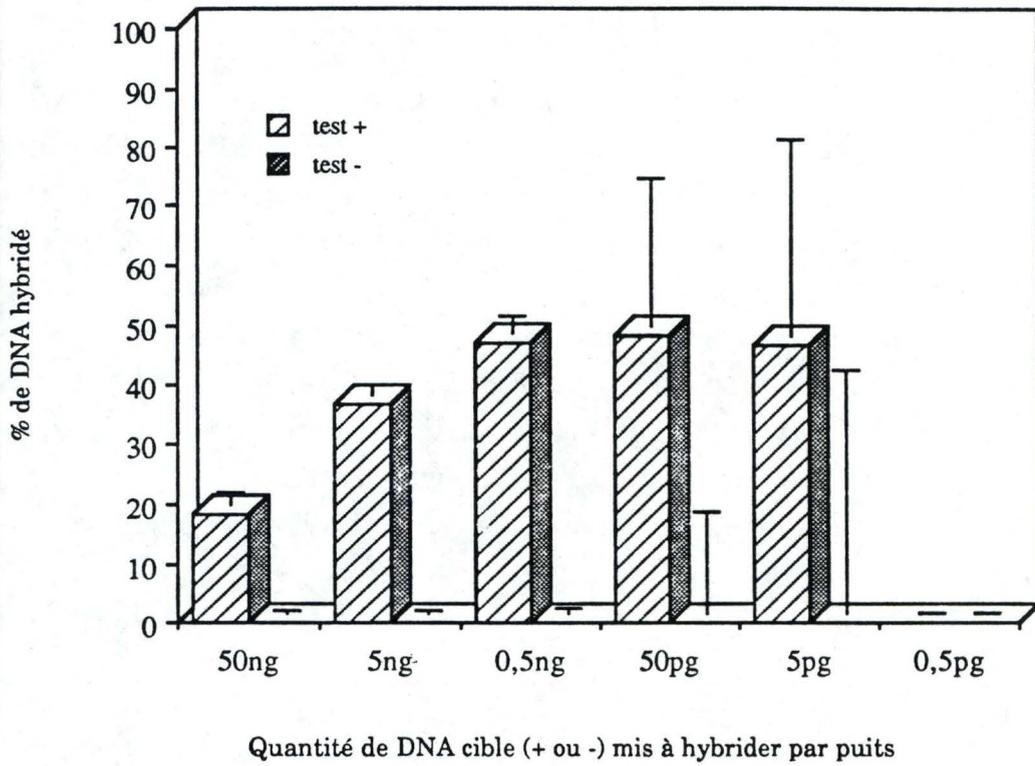


Figure n°33a : Pourcentage d'ADN cible hybridé au trappeur en fonction de la concentration d'ADN cible .  
 Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

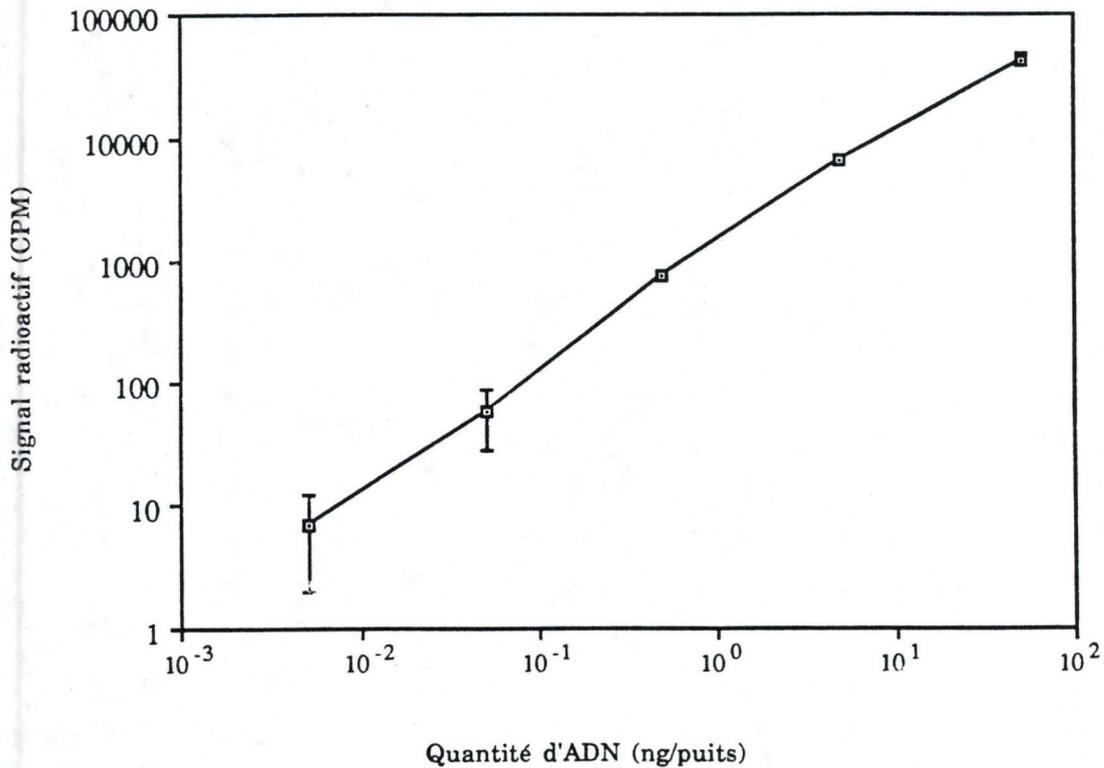


Figure n°33b : Courbe de concentration en ADN cible (CPM en fonction de la quantité d'ADN cible/puits).  
 Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

### C. Courbe de concentration d'ADN cible

Les conditions fixées restent les mêmes que l'expérience précédente en utilisant, cette fois, une solution d'hybridation SSC 2X seulement et différentes concentrations d'ADN cible.

Les résultats sont montrés aux figures 33a et 33b.

Ces résultats sont très importants au niveau théorique sur plusieurs points.

Le pourcentage d' hybridation atteint au maximum 50 %, et cela même si on diminue d'avantage la quantité d'ADN cible. Ce qui laisse penser que nous sommes arrivés à un plateau fixé à 50 % d'hybridation. Le fait qu'on ne puisse hybrider plus de 50 %, de l'ADN de départ, nous laisse croire qu'il n'y aurait jamais qu'un seul des deux brins qui resterait hybridé après lavage. On peut envisager qu'un des deux brins puisse être hybridé dans une conformation peu stable qui ne résisterait pas aux lavages (fig.34).

La quantité d'ADN trappeur fixé étant de 529 fm, et celle de l'ADN cible donnant encore 50 % d'hybridation étant de 2,6 fm (fig.35), cela veut dire qu'il faut au moins 200X plus d'ADN fixé que d'ADN cible pour avoir cette hybridation maximum.. En effet, si ce rapport est plus faible que 200X, le pourcentage d'hybridation est moindre.

Explication cinétique:

Dans les conditions que nous utilisons, la réaction d'hybridation est une compétition entre les deux formes d'hybrides: l'hybride ADN cible avec le trappeur et l'hybride ADN cible avec son brin complémentaire .

Plus la concentration en ADN cible augmente, plus le réappariement avec son brin complémentaire est favorisé vu le nombre de brins complémentaires plus grand par rapport au fragment trappeur fixé (qui lui est en concentration constante).

Nous pouvons retenir de cette expérience, que lorsque le test se fera sur un échantillon clinique, il faudra procéder à différentes dilutions de celui-ci afin que l'intensité du signal ne dépende que de la quantité d'ADN et ne soit pas faussé par une cinétique d'hybridation variant selon la concentration d'ADN cible.

### D. Etude des lavages

Jusqu'à présent nous ne lavions qu'avec une solution de lavage de stringence faible (SSC 1X). Vu la stabilité des hybrides, nous pensons que des

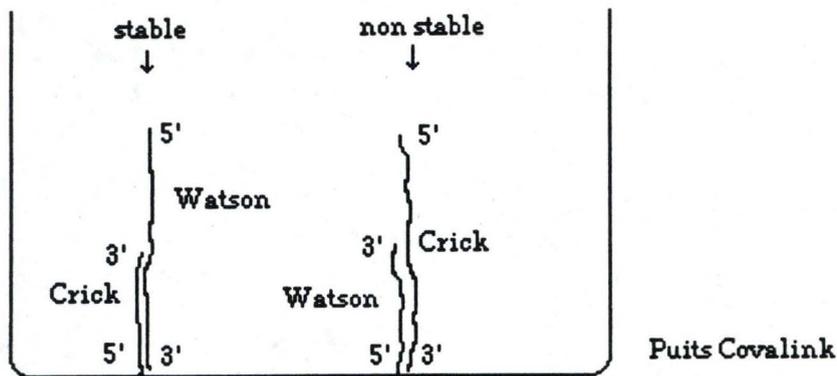


Figure n°34 : Représentation des deux conformations d'hybridation qui existeraient selon que l'hybridation se fait sur le "trappeur Watson" ou "Crick".

Quantité d'ADN trappeur  
fixé par puits

Quantité d'ADN cible  
mis à hybrider par puits

529 femtomoles

↑  
—————→  
200X

260 femtomoles = 50 ng

26 femtomoles = 5 ng

2,6 femtomoles = 0,5 ng

0,26 femtomoles = 0,05 ng

26 atomoles = 5 pg

2,6 femtomoles = 0,5 pg

← A partir de cette quantité  
l'hybridation est max.(50%)

← Seuil de détection

L'hybridation y est de 50%

Figure n°35 : Il faut au moins 200 X plus d'ADN trappeur que d'ADN cible pour obtenir un rendement d'hybridation maximum. La plus petite quantité d'ADN cible détectée en radioactivité est 5 pg/puits. Plus bas, le signal radioactif est trop faible pour être détecté.

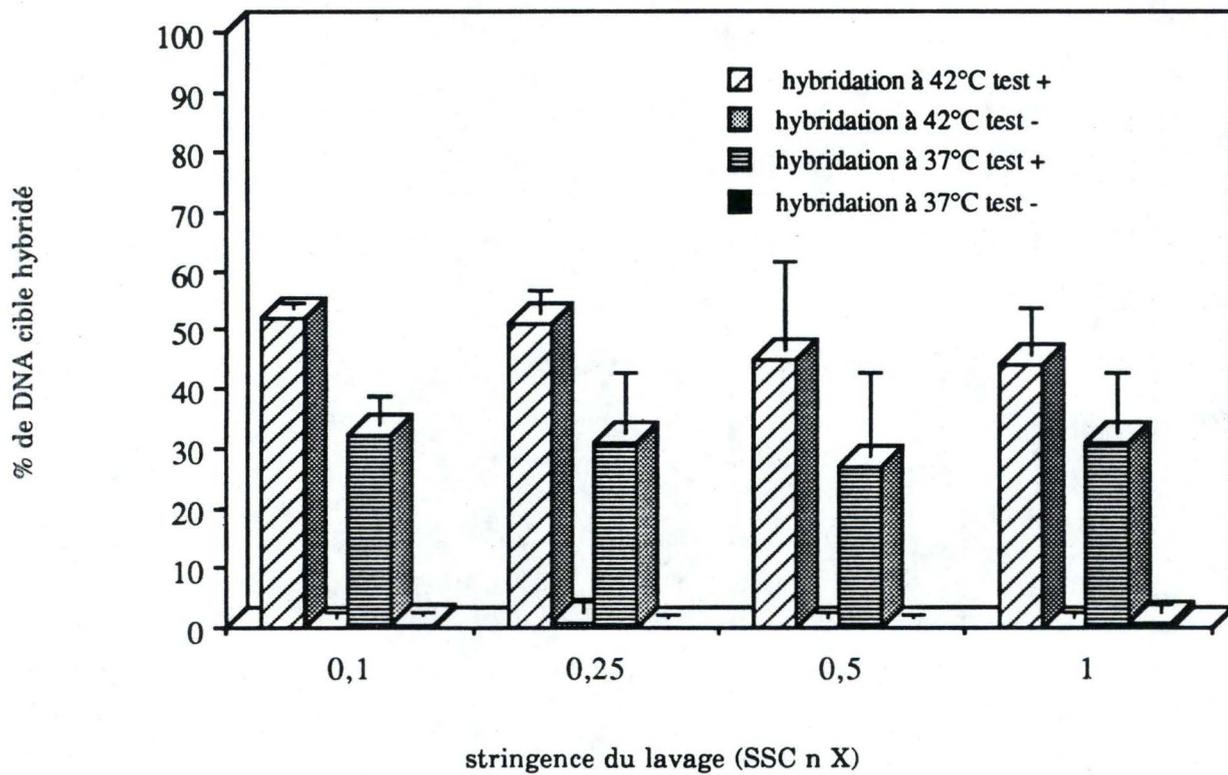


Figure n°36 : Pourcentage d'ADN cible hybridé au trappeur en fonction de la stringence des lavages pour deux températures différentes (37°C et 42°C).  
 Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

	Fixation sur Covalink	Hybridation simple avec 0,5 ng ADN cible
pb	288 -P en 5'	414
[ ]	100 ng/puits = 1058 fentomoles	0,5 ng/puits = 2,6 fentomoles
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 fentomoles	50% = 250 pg/puits = 1,3 fentomoles
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C	Rinçage avec SSC 2x Solution hybridation : - Denhart 5x - ADN Herring sperm - SSC 2x 42°C 20H d'incubation 1 lavage SSC 0,1x -Spécificité très bonne

Figure n°37 : Tableau récapitulatif reprenant les conditions et les rendements optimaux de l'hybridation de l'ADN cible au trappeur obtenus avec 0,5 ng d'ADN cible/puits.

lavages plus stringents pourraient être envisagés.

Les solutions de lavage testées sont: SSC 1X, 0,5X, 0,25X, 0,1X.

La quantité d'ADN cible par puits est de 0,5 ng comme dans l'expérience précédente.

Résultats (fig.36).

° Concernant la spécificité: nous n'observons toujours pas ou très peu d'hybridation non spécifique même au lavage le moins stringent et à la température la plus basse.

° Concernant les lavages: il faut, en fait, trouver le meilleur compromis entre la plus grande stringence possible pour ne donner aucune chance à l'hybridation non spécifique, et une stringence pas trop forte pour ne pas séparer les hybrides spécifiques. Nous pouvons dans notre cas augmenter la stringence jusqu'à du SSC 0,1X sans observer la moindre diminution du pourcentage d'hybridation spécifique.

Nous avons refait la même expérience mais à température d'hybridation de 37°C. Cette même figure 36 nous montre que cette température n'est pas suffisante pour obtenir une hybridation maximale.

E. Conclusion:

Les conditions d'hybridation simples optimales requièrent une quantité d'ADN cible de départ de 0,5 ng et une solution d'hybridation avec du SSC 2X. L'incubation dure 20 heures à 42°C et les lavages se font avec du SSC 0,1X à 4°C pendant 5 minutes.

La figure 37 récapitule les résultats et conditions optimales de l'hybridation simple.

## **VII HYBRIDATION SANDWICH EN RADIOACTIVITE**

Les conditions d'hybridation simple étant maintenant optimisées, nous allons à présent aborder la mise au point de l'hybridation dite en sandwich. Cette méthode fait intervenir un fragment de plus par rapport à l'hybridation simple, qui est la sonde spécifique d'une partie de l'ADN cible. Cette sonde détectrice est marquée radioactivement au P<sup>32</sup>

## VII.1. CHRONOLOGIE DES HYBRIDATIONS

Deux scénarios d'hybridation en sandwich sont possibles, différents par le moment où l'on ajoute l'ADN sonde.

On peut en effet dans un premier temps procéder à l'hybridation du trappeur et de l'ADN cible suivie dans un deuxième temps par l'ajout de la sonde qui vient s'hybrider à l'hybride trappeur - ADN cible déjà formé.

Le deuxième scénario, est d'ajouter l'ADN cible et la sonde au même moment, réalisant l'hybridation trappeur-ADN cible et l'hybridation ADN cible-sonde en même temps.

Ces deux hybridations se réalisant plus ou moins dans les mêmes conditions (un fragment de 124 à 288 pb s'hybridant à un fragment de 414 pb), nous avons tenté de faire l'hybridation en une seule étape. Ceci nous épargne une incubation supplémentaire, des lavages et surtout une dénaturation obligatoire avant la deuxième hybridation.

Après l'hybridation sandwich, l'ADN cible est recouvert sur toute sa longueur évitant ainsi la formation de réseaux qu'il y aurait s'il restait des brins libres après hybridation.

## VII.2. OPTIMALISATION DE L'HYBRIDATION SANDWICH

Les deux hybridations se faisant dans les mêmes conditions, nous avons pensé qu'il fallait avoir une quantité de sonde semblable à celle du trappeur fixé. Or, nous fixons dans les puits Covalink 50 % des 100 ng de départ d'ADN trappeur, soit 50 ng de fragment de 288 pb ou encore 529 fm d'ADN par puits. La quantité de sonde ajoutée est du même ordre de grandeur (500 fm/puits).

L'expérience est réalisée dans deux solutions de stringence différente (SSC 1X et SSC 2X). avec une quantité de 5 ng d'ADN cible/puits et des lavages aux SSC 1X. Tout autre paramètre restant inchangé par rapport aux conditions mises au point lors de l'hybridation simple.

En mettant autant de sonde que de trappeur fixé, l'excès de sonde est très grand par rapport à l'ADN cible qui peut s'hybrider au trappeur.

La figure 33a montrait que dans le cas d'une hybridation simple réalisée avec 5 ng d'ADN cible/puits (26 fm d'ADN cible/puits), on pouvait en fixer au maximum  $\pm 36\%$ , soit 9,4 fm ( $36\% \text{ de } 26 = 9,4$ ). Ce qui veut dire que dans ces conditions, au maximum 9,4 fm de sondes peuvent être hybridées dans l'hybridation sandwich. Or dans cette expérience, on en met 500 fm, soit 53X

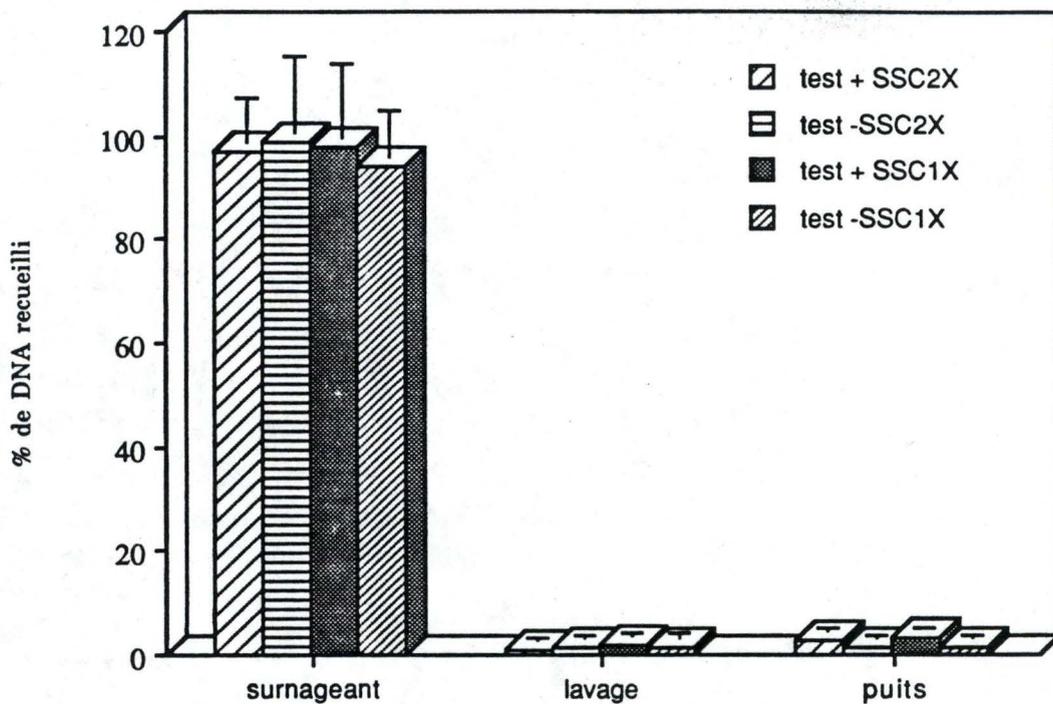


Figure n°38a : Hybridation sandwich dans deux milieux de stringence différente (SSC 2X et SSC1X) avec 5 ng d'ADN cible /puits. Pourcentage de sonde recueillie dans les différentes fractions. La quantité de sonde est de 500 fmoles/puits, ce qui représente un excès de sonde de 53X par rapport à l'ADN cible pouvant s'hybrider au trappeur. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm$  2s (écart type). Les pourcentages d'ADN cible recueillis dans les puits sont repris figure 38b.

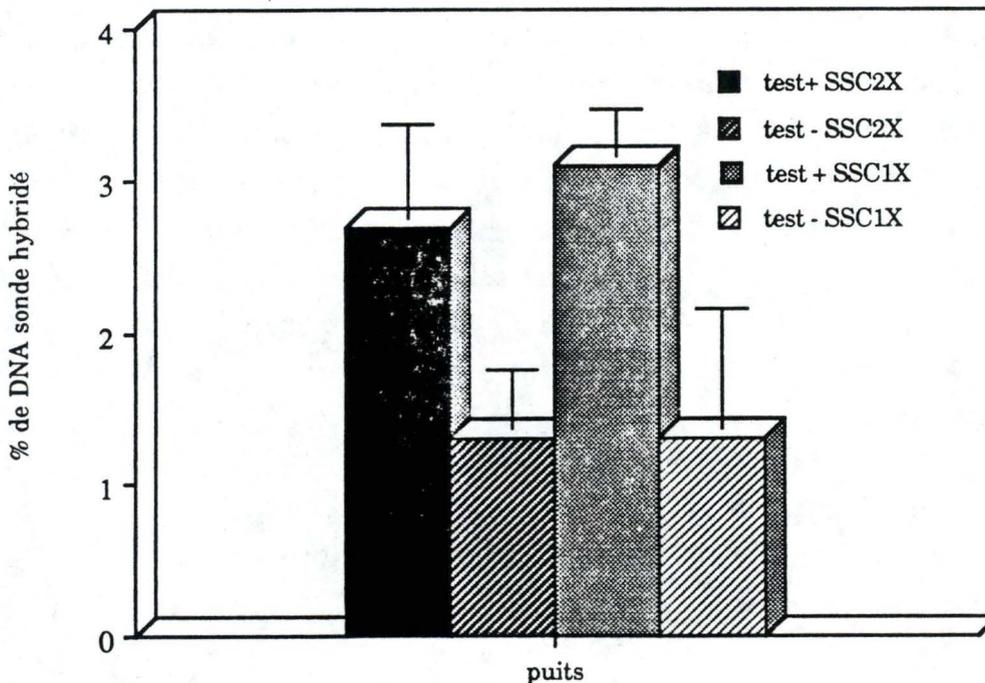


Figure n°38b : Hybridation sandwich dans deux milieux de stringence différente (SSC 2X et SSC1X) avec 5 ng d'ADN cible /puits. Pourcentage de sonde recueillie dans les puits. La quantité de sonde est de 500 fmoles/puits, ce qui représente un excès de sonde de 53X par rapport à l'ADN cible pouvant s'hybrider au trappeur.

plus ( $500=53 \times 9,4$ ). Ce large excès explique que la majeure partie d'ADN sonde est retrouvée dans les surnageants (fig.38a et 38b). Il ne faut donc pas être surpris du très faible pourcentage de sonde hybridé. En effet, si 1,4 % de sonde sont hybridés spécifiquement, soit 7 fm sur les 9,4 fm "hybridables", cela représente un bon rendement d'hybridation de 74,7 % (fig.39) (dorénavant les pourcentages seront exprimés de cette façon plus parlante).

Le problème de l'excès de sonde ne se situe donc pas tellement au niveau du rendement, mais plutôt au niveau de la spécificité de l'hybridation. Vu la quantité importante de sonde, l'hybridation non spécifique devient importante au point de représenter 48 % de l'hybridation (1,3 % d'hybridation non spécifique pour 2,7 % d'hybridation spécifique) (figure 38b-SSC 2X).

#### A. Etude de l'excès de sonde à utiliser

Nous utilisons pour cette expérience et pour toutes celles à suivre, une quantité d'ADN cible de 2,6 fm par puits (0,5 ng/puits) qui donne le meilleur rendement d'hybridation simple.

Trois concentrations de sonde beaucoup plus basses que la précédente ont donc été testées afin de diminuer l'hybridation non spécifique. Les quantités de sonde sont 3X, 2X, 1X en excès par rapport à l'ADN cible hybridé au trappeur dans ces conditions (c'est à dire 3X, 2X, 1X en excès par rapport à 1,3 fm comme expliqué à la figure 40).

Les résultats sont montrés à la figure 41a.

En diminuant l'excès de sonde, on résout le problème de la non spécificité, mais les pourcentages d'hybridation sont naturellement plus bas aussi (et d'autant plus bas que la quantité de sonde est petite). Il faut donc trouver un bon compromis entre un excès suffisant pour obtenir une hybridation importante, mais pas trop élevé afin d'éviter l'hybridation non spécifique (cette étude fera l'objet de l'expérience suivante).

Concernant le lavage, nous retenons la solution de lavage au SSC 0,1X car elle ne laisse aucune trace d'hybridation non spécifique.

Une nouvelle expérience consiste à voir jusqu'à quel excès de sonde on peut "monter" sans avoir d'hybridation non spécifique.

Pour cela, les tests ont été réalisés avec différentes concentrations de sonde, mais sans ADN cible ou avec de l'ADN cible non spécifique. Toutes les hybridations seraient alors purement non spécifiques, causées par un excès de sonde trop important.

	Fixation sur Covalink	Hybridation simple avec 5 ng ADN cible	Hybridation sandwich
pb	288 -P en 5'	414	124
[ ]	100 ng/puits = 1058 fentomoles	5 ng/puits = 26 fentomoles	20,55 ng/puits = 500 fentomoles = 53x la quantité d'ADN cible hybridé
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 fentomoles	36,6% = 1,27 ng/puits = 9,4 fentomoles	2,7%sp.-1,3% nsp. = 1,4% = 13,5fm-6,5fm=7fm
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C	Rinçage avec SSC 2x Solution hybridation : - Denhart 50x - ADN Herring sperm - SSC 2x - 42°C - 20H d'incubation 1 lavage SSC 1x -Spécificité très bonne	Idem Non spécificité. élevé

Figure n°39 : Tableau récapitulatif reprenant les conditions et résultats de l'hybridation simple et de l'hybridation sandwich avec 5 ng d'ADN cible/puits et une quantité de sonde de 500 fmoles (soit 53X en excès par rapport à la quantité d'ADN cible hybridée au trappeur).

	Fixation sur Covalink	Hybridation simple avec 0,5 ng ADN cible	Hybridation sandwich
pb	288 -P en 5'	414	124
[ ]	100 ng/puits = 1058 femtomoles	0,5 ng/puits = 2,6 femtomoles	3x en excès = 3 x 1,3 = 3,9 fm 2x en excès = 2 x 1,3 = 2,6 fm 1x en excès = 1 x 1,3 = 1,3 fm
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 femtomoles	50% = 250 pg/puits = 1,3 femtomoles	
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C	Rinçage avec SSC 2x Solution hybridation : - Denhart 50x - ADN Herring sperm - SSC 2x 42°C 20H d'incubation 1 lavage SSC 0,1x -Spécificité très bonne	

Figures n°40 : Tableau récapitulatif expliquant la quantité de sonde à utiliser pour qu'elle soit 3X, 2X et 1X en excès par rapport à l'ADN cible hybridé au trappeur.

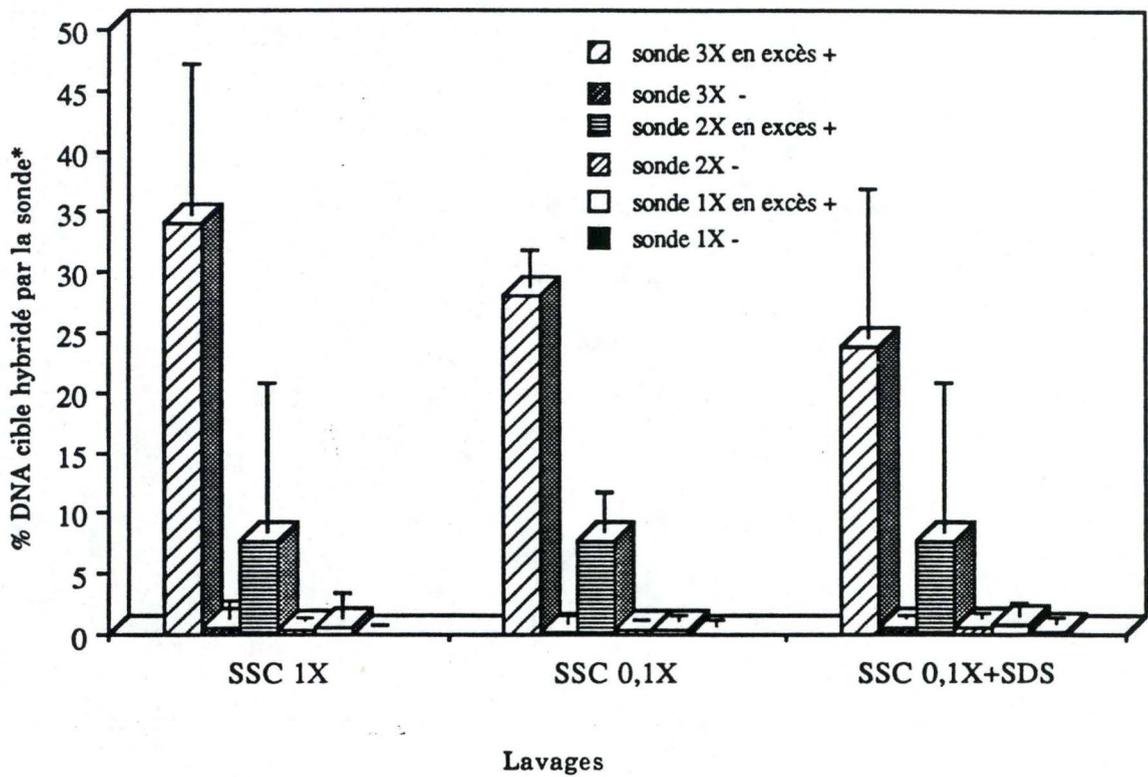


Figure n°41a : Pourcentage de sonde hybridée à l'ADN cible en fonction de la concentration de la sonde et pour trois types de lavages différents. La concentration d'ADN cible est de 0,5 ng/puits. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

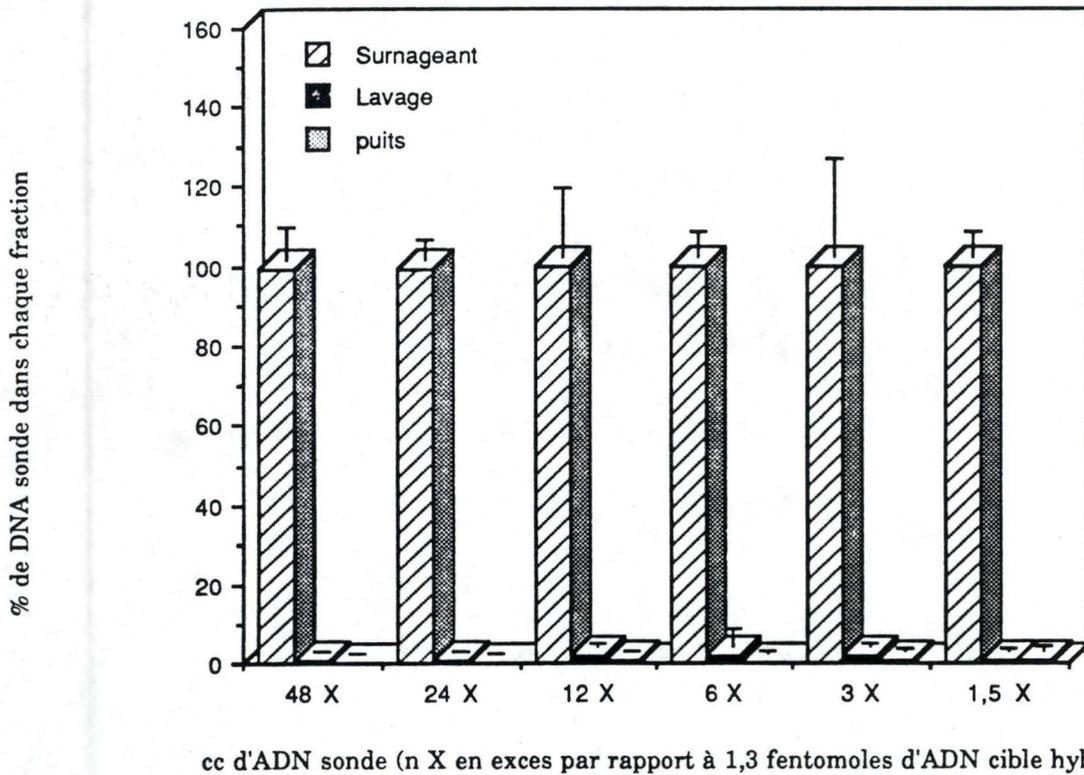


Figure n°41b : Pourcentage de sonde dans les différentes fractions en fonction de sa concentration. En l'absence d'ADN cible spécifique à la sonde, celle-ci se retrouve quasi totalement dans le surnageant, et ceci même aux fortes concentrations de sonde. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

Les résultats sont montrés à la figure 41b.

Il n'y a pas d'hybridation non spécifique de l'ADN sonde ni sur la plaque Covalink, ni sur l'ADN trappeur fixé au fond des puits, ni sur l'ADN cible non spécifique. Ceci même à une concentration en sonde élevée comme 48 X en excès. Les lavages en conditions stringentes (SSC 0,1X) jouent certainement un rôle important pour diminuer l'hybridation non spécifique. Nous choisissons pour les expériences ultérieures un excès de sonde de 9X.

## B. Courbe de concentration en ADN cible

Cette courbe de concentration nous permet de savoir quelle quantité minimum d'ADN cible est détectable par la sonde radioactive.

Les conditions appliquées dans cette expérience sont les suivantes:

- la solution d'hybridation est composée de SSC 2X
- la durée d'incubation est de 15 heures à 45°C
- la solution de lavage utilisée est du SSC 0,1X
- la quantité de sonde est de 11,7 fm/puits (11,7 fm = 9 x 1,3 fm ce qui correspond donc à une concentration en sonde de 9X en excès pour la concentration en ADN cible de 0,5 ng/puits)

La courbe de concentration est représentée à la figure 42a.

On obtient également un graphe (figure 42b) dont le profil est fort similaire à la courbe de concentration réalisée en hybridation simple (fig.33a). Ici aussi, de trop hautes concentrations en ADN cible donnent un rendement d'hybridation plus faible, sans doute pour les mêmes raisons due à la cinétique d'hybridation en solution qui devient importante.

Plus la concentration en ADN cible diminue, plus le pourcentage d'hybridation augmente jusqu'à un plateau de détection qui est ici à un peu près de 50%. Des quantités trop faibles d'ADN cible telles que 0,5 pg et 0,1 pg ne sont plus détectables par la radioactivité.

- Le tableau récapitulatif (fig.43) reprend toutes les conditions à partir de la fixation jusqu'à l'hybridation sandwich avec la plus petite quantité d'ADN cible détectée en radioactivité.

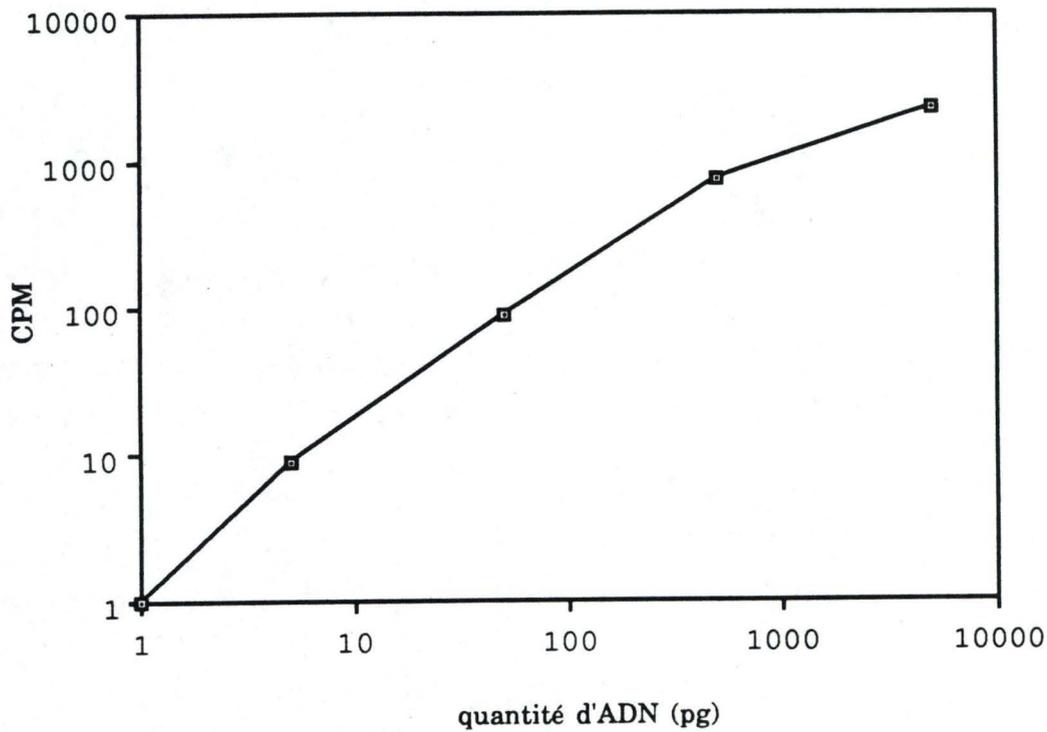


Figure n°42a : Courbe de concentration d'ADN sonde en hybridation sandwich. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples.

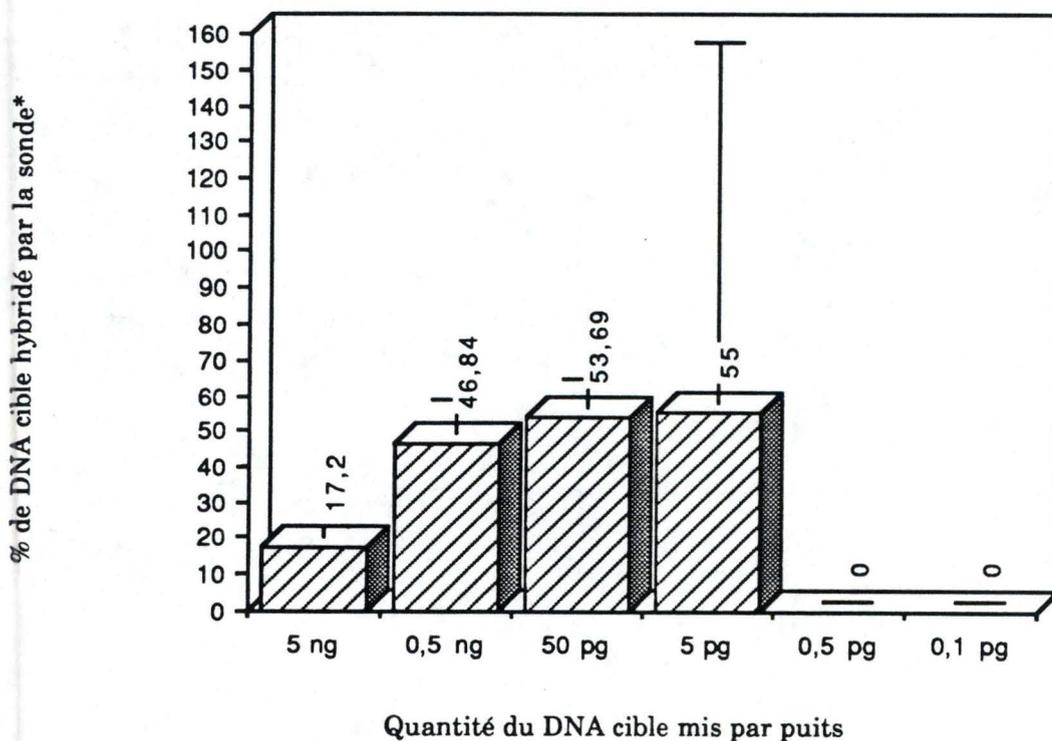


Figure n°42b : Pourcentage de sonde hybridée à l'ADN sonde en fonction de la concentration en ADN cible. Dans ces conditions d'hybridation, la plus petite quantité d'ADN cible détectée en radioactivité est 5 pg.

	Fixation sur Covalink	Hybridation simple avec 5 pg ADN cible	Hybridation sandwich
pb	288 -P en 5'	414	124
[ ]	100 ng/puits = 1058 fentomoles	5 pg/puits = 26 atomoles	9x1,3 fm/puits = 11,7 fentomoles
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 fentomoles	46,6% = 1,65 pg/puits = 12,12 atomoles	0,057% = 6,67 atomoles
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C	Rinçage avec SSC2x Solution hybridation : - Denhart 50x - ADN Herring sperm - SSC 2x 45°C 15H d'incubation 1 lavage SSC 0,1x	

Figure n°43 : Tableau récapitulatif reprenant les conditions à partir de la fixation du trappeur jusqu'à l'hybridation sandwich avec la plus petite quantité d'ADN cible détectée en radioactivité (5pg/puits). Dans ces conditions, le pourcentage d'hybridation de la sonde à l'ADN cible est de 55 % (6,67 atomoles de sonde hybridées sur les 12,12 atomoles d'ADN cible "hybridables"=55 %).

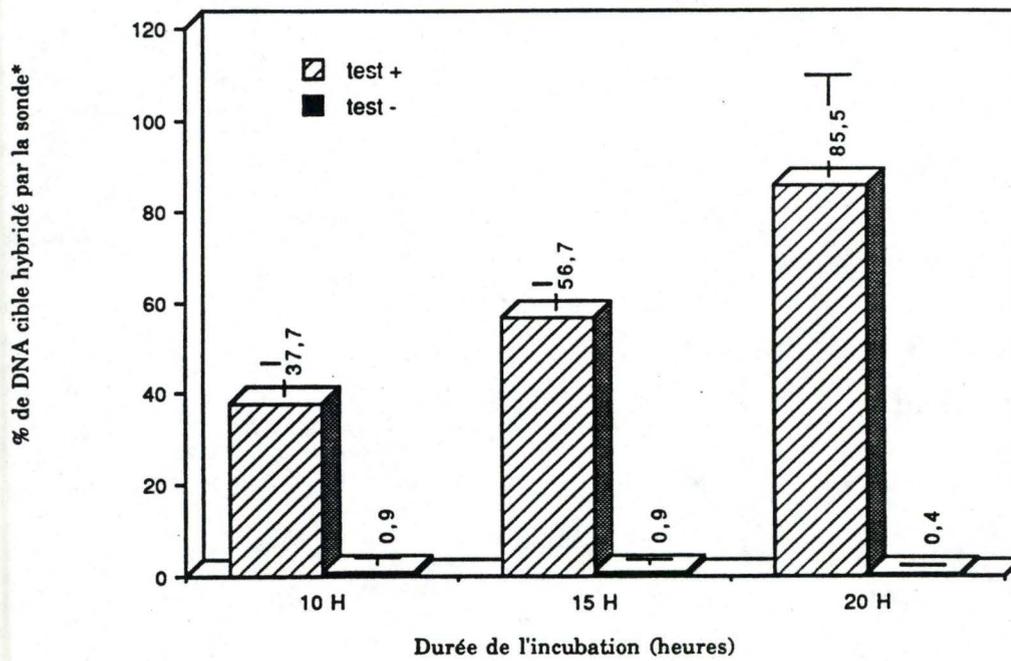


Figure n°44a : Hybridation en sandwich à 42°C pour différents temps d'incubation. La quantité de sonde est de 9X en excès par rapport à la quantité d'ADN cible hybridée au trappeur. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

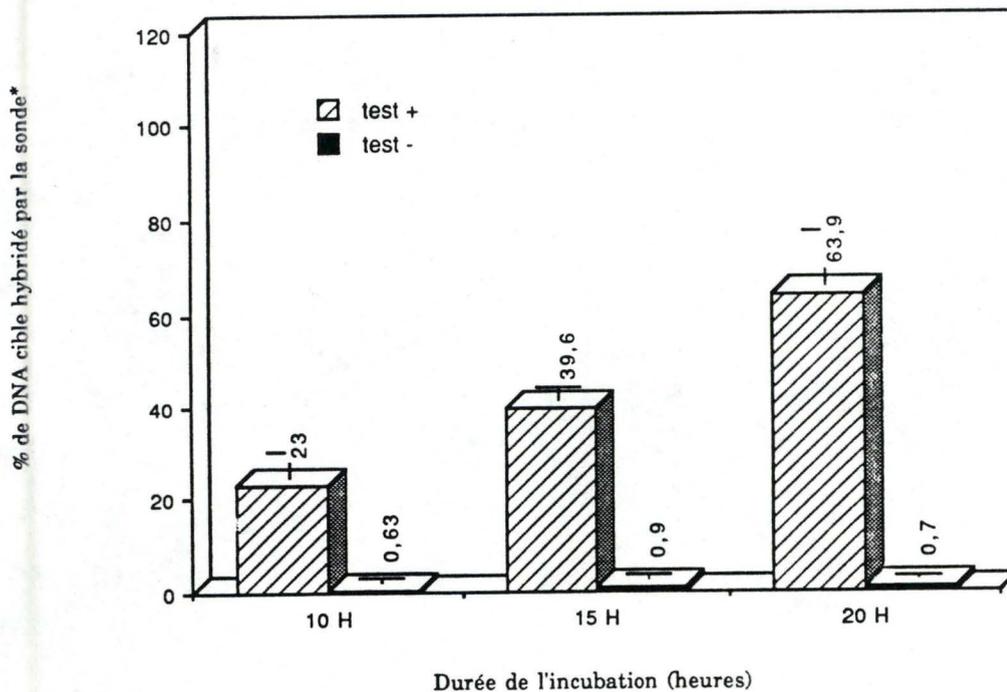


Figure n°44b : Hybridation en sandwich à 45°C pour différents temps d'incubation. La quantité de sonde est de 9X en excès par rapport à la quantité d'ADN cible hybridée au trappeur. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

### C. Optimisation de la température d'hybridation et de la durée d'incubation

#### - La température:

Nous savons qu'une température inférieure à 42°C est défavorable à l'hybridation. Nous essayons cette fois deux températures supérieures (45°C et 48°C) afin de trouver la température optimale de l'hybridation en sandwich.

#### - La durée d'incubation:

Une durée de 20 heures donne de bons résultats et est pratique du point de vue horaire. Mais, ce qui intéresse les demandeurs de kit de détection, c'est une révélation du test le plus rapidement possible, le jour même s'il y a moyen. Or, avec une incubation de 20 heures, les résultats ne sont disponibles que le lendemain.

Des incubations de 10 et 15 heures ont donc été testées afin de voir s'il était possible de diminuer la durée d'incubation tout en gardant un bon rendement d'hybridation. L'excès de sonde est toujours de 9X par rapport à l'ADN cible hybridé au trappeur.

#### - Résultats:(figure 44a, b, c et d)

##### ° Concernant la durée d'incubation

De nouveau, l'incubation de longue durée est plus favorable et donne les pourcentages d'hybridation les plus élevés quelle que soit la température.

##### ° Concernant la spécificité

Comme précédemment observé, l'hybridation non spécifique est quasi inexistante après des temps d'incubation si longs.

##### ° Concernant la température

La figure 44d nous montre que des températures supérieures à 42°C nous donnent un pourcentage de détection plus important et plus rapide puisqu'après 10 heures le pourcentage de sonde hybridée est supérieur à 48°C par rapport à 45°C et par rapport à 42°C. Il semble que la température optimale pour une durée d'incubation de 20 heures soit de 45°C.

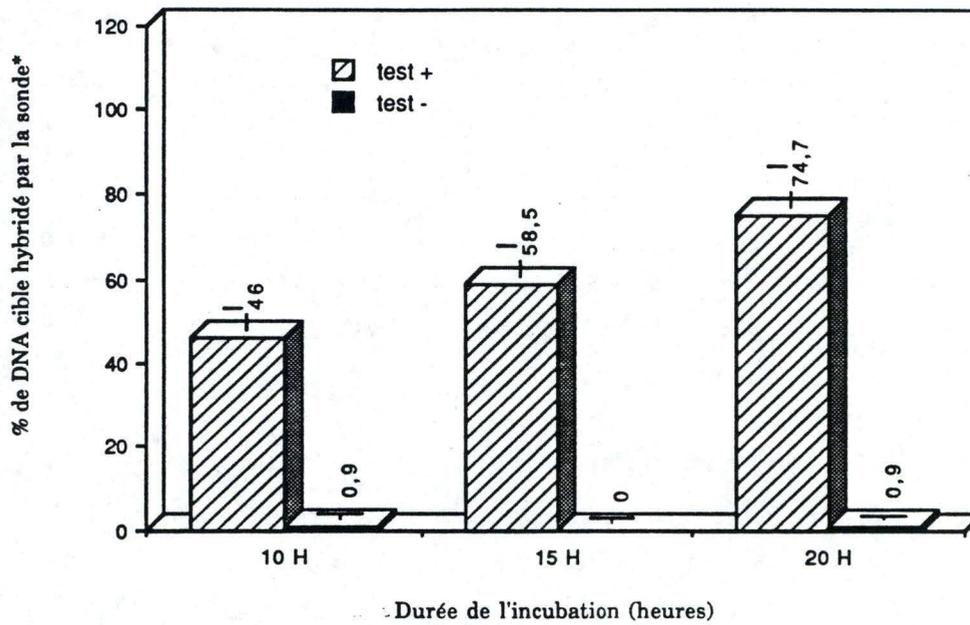


Figure n°44c : Hybridation en sandwich à 48°C pour différents temps d'incubation. La quantité de sonde est de 9X en excès par rapport à la quantité d'ADN cible hybridée au trappeur. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

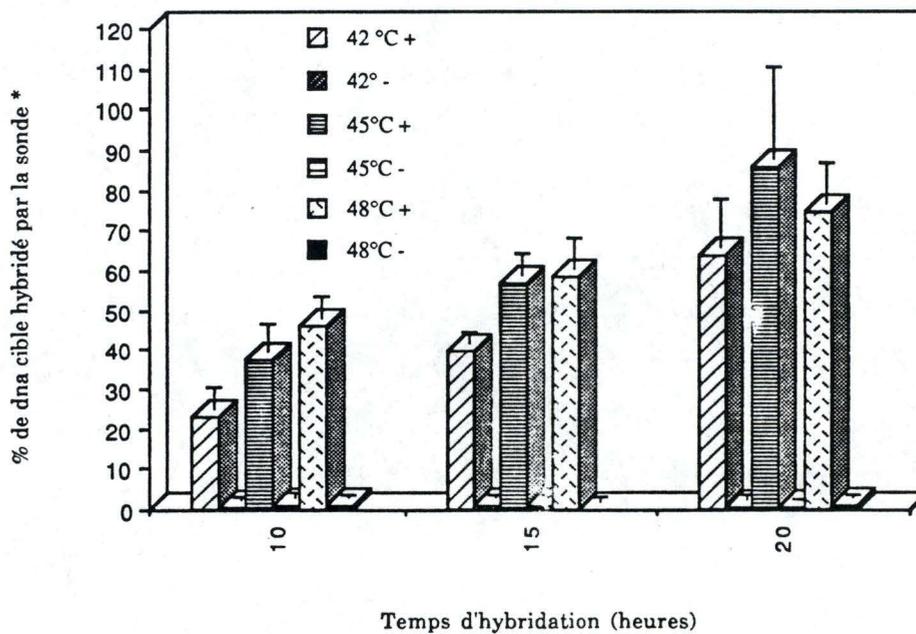


Figure n°44d : Hybridation en sandwich à 42°C, 45°C et 48°C pour différents temps d'incubation. La quantité de sonde est de 9X en excès par rapport à la quantité d'ADN cible hybridée au trappeur. Les valeurs de ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

	Fixation sur Covalink	Hybridation simple avec 0,5 ng ADN cible	Hybridation sandwich
pb	288 -P en 5'	414	124
[ ]	100 ng/puits = 1058 femtomoles	0,5 ng/puits = 2,6 femtomoles	482 pg/puits = 11,7 femtomoles (9 X 1,3 femtomoles)
%	± 50% = 50 ng/puits = 529 femtomoles	50% = 250 pg/puits = 1,3 femtomoles $\xleftrightarrow{85,5\%}$	9,5 % 1,97 pg/puits = 1,11 femtomoles
Cond.	MeIM 0,1M pH 7,5 EDC 0,2M 100 ng d'ADN purifié sur S200 /H <sub>2</sub> O 50°C 5H d'incubation 2 lavages NaOH 0,2N Séchage Stockage à 4°C	Rinçage avec SSC 2x Solution hybridation : - Denhart 50x - ADN Herring sperm - SSC 2x 42°C 20H d'incubation 1 lavage SSC 1x -Spécificité très bonne	idem        - Spécificité très bonne

Figure n°44e : Tableau récapitulatif des conditions optimales d'hybridation sandwich pour laquelle on obtient un pourcentage d'hybridation de la sonde à l'ADN cible de 85,5%. Ce sont ces conditions que dorénavant nous utiliserons .

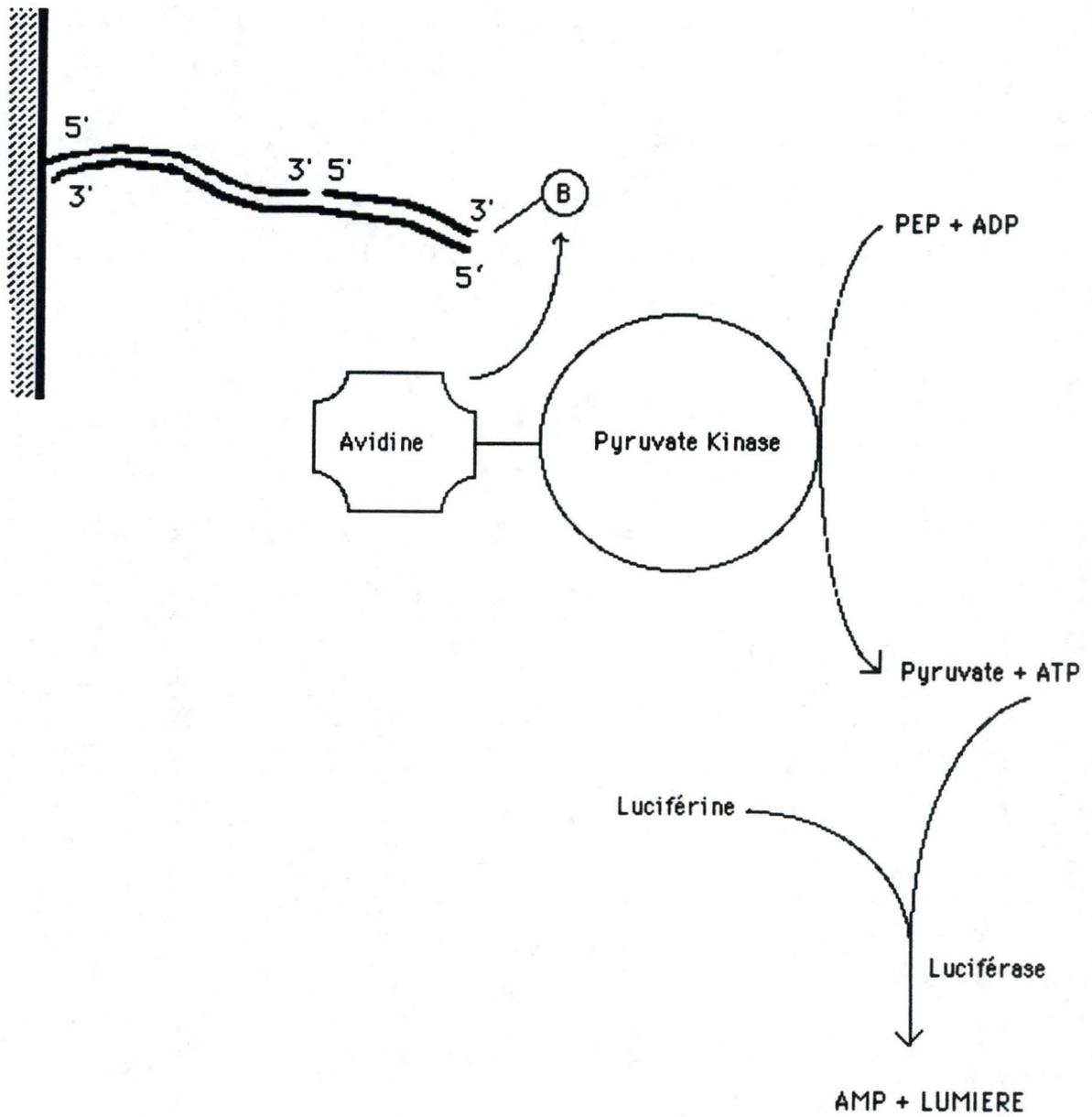


Figure n°45 : Représentation schématique du système de détection de la sonde biotynilée. La sonde biotynilée est reconnue par la streptavidine couplée à la pyruvate kinase. Cet enzyme en présence de ces substrats (PEP et ADP) produit de l'ATP. Celui-ci, en présence de luciférine est utilisé par la luciférase pour produire de la lumière. Cette émission de lumière nous fournit un moyen de quantification de la sonde hybridée à l'ADN cible.

B = biotine : PM = 500  
 streptavidine : 60 000  
 Pyruvate Kinase : 250 000

Conclusion:

Les conditions optimales d'hybridation sandwich adoptées sont donc:

- ° solution d'hybridation avec SSC 2X
- ° concentration en sonde 9X en excès par rapport à l'ADN cible hybridé au trappeur
- ° 20 heures d'incubation à 45°C
- ° la solution de lavage est du SSC 0,1X à 4°C

Le tableau récapitulatif (fig.44e) reprend toutes les conditions (à partir de la fixation jusqu'à l'hybridation sandwich) avec lesquelles nous obtenons un pourcentage d'hybridation sandwich maximal, qui est de 85,5 %.

## **VIII. HYBRIDATION SANDWICH EN BIOLUMINESCENCE**

### VIII.1. LE SYSTEME DE REVELATION EN BIOLUMINESCENCE

#### A. Rappel du principe

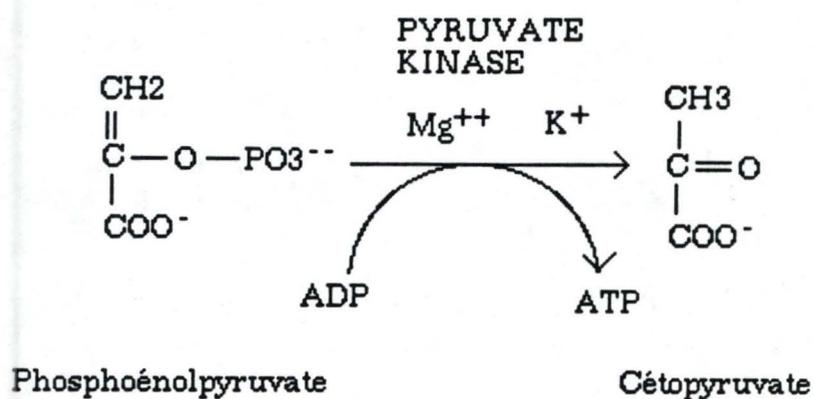
La détection de sonde froide fait appel à des systèmes enzymatiques couplés à une molécule intermédiaire capable de reconnaître des motifs fixés sur la sonde.

La figure 45 rappelle le système de détection que nous avons choisi.

#### B. Le système Avidine-Biotine

L'avidine est une glycoprotéine isolée du blanc d'oeuf. Elle possède une constante d'affinité extrêmement faible ( $K_d = 10^{-15}$ ) vis à vis de la biotine la vitamine H) et peut ainsi se fixer avec une très grande affinité sur cette molécule.

Malheureusement, l'avidine utilisée pour la détection d'hybrides fixés sur nitrocellulose se montre responsable d'hybridation non spécifique. Afin de remédier à ce problème, l'avidine a été remplacée par la streptavidine présentant la même affinité pour la biotine, mais sans la partie glycosylée responsable du bruit de fond élevé (Leback 1987). Bien que nous ne travaillions pas sur ce type de support, nous avons préféré, par sécurité, employer également la streptavidine.



$$\Delta G^0 = -7,5 \text{ Kcal/mole}$$

Figure n° 46 : Réaction de transfert du phosphate riche en énergie du PEP à l'ADP catalysée par la pyruvate kinase.

Figure  
Constituants de la réaction luciférasique.

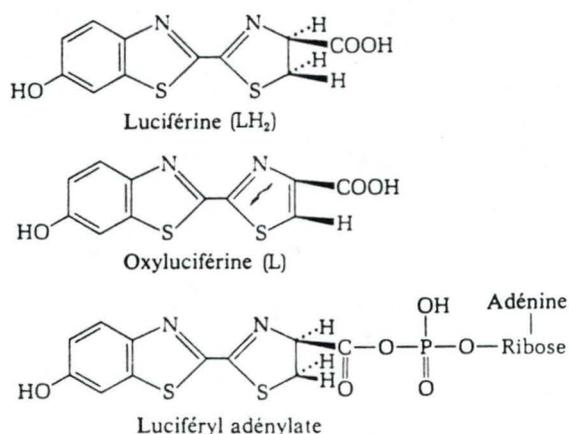


Figure n°47 : Molécule de luciférine et ses dérivés (Leninger éd.1989 p.388)

### C. Le conjugué

On appelle le conjugué la streptavidine couplée à la pyruvate kinase. Ce couplage a été réalisé au laboratoire selon la méthode décrite dans le brevet n°09200827. Le conjugué streptavidine-peroxidase de Raifort (HRP) dont la révélation se fait soit en chémoluminescence soit en spectrophotométrie, a aussi été réalisé au laboratoire, et nous a été utile pour la mise au point de certaines étapes indépendantes de la bioluminescence.

### D. La production d'ATP

La réaction (fig.46) catalysée par la pyruvate kinase est la dernière étape de la glycolyse et consiste en un transfert du P riche en énergie du Phosphoénol pyruvate (PEP) à l'ADP. L'ensemble de la réaction possède une variation d'énergie libre standard ( $\Delta G_0$ ) très largement négative. Le  $\Delta G_0$  d'hydrolyse du PEP est de -14,8 Kcal/mole et le  $\Delta G_0$  de la réaction globale est de -7,5 Kcal/mole, ce qui signifie un déplacement de l'équilibre de la réaction fortement vers la formation des produits.

### E. Production de la lumière

De nombreux champignons, des microorganismes marins, des méduses ainsi que des vers luisants sont capables de générer une bioluminescence qui nécessite des quantités considérables d'énergie. Chez le vers luisant, une combinaison d'ATP et d'énergie oxydative est utilisée en un ensemble de deux réactions qui transforment l'énergie chimique en énergie lumineuse. Les principaux composés biochimiques impliqués sont: la luciférine (fig.47), qui est un acide carboxylique complexe et la luciférase, un enzyme. La formation d'un flash lumineux nécessite que la luciférine soit d'abord oxydée par une réaction enzymatique avec l'ATP pour former du luciféryl adénylate. Ce composé subit alors l'action de l'oxygène moléculaire et de la luciférase, ce qui provoque une décarboxylation oxydative de la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction est accompagnée d'émission de lumière. La sensibilité de ce système est très forte puisque quelques picomoles ( $10^{-12}$  mole) d'ATP peuvent être ainsi détectées.

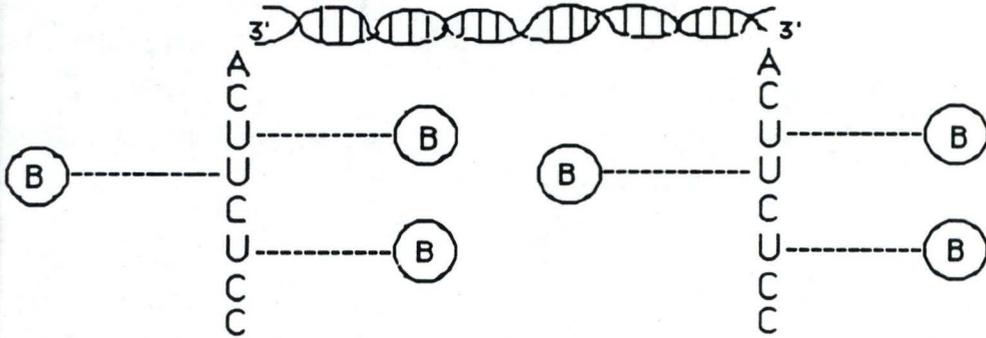


Figure n°48 : Sonde biotinyllée à son extrémité 3' par l'action de la terminale deoxynucleotidyl transférase qui ajoute une chaîne d'environ 7 nucléotides, dont certains sont biotinyllés, après 1 heure de réaction à 37°C.

## F. La biotinylation de la sonde

La réaction est menée par la terminal déoxynucléotidyle transférase qui ajoute des dNTP à l'extrémité 3' du fragment d'ADN (Bollum 1974). En présence de dCTP et de 16-d UTP biotinylés, c'est une fois l'un, une fois l'autre que l'enzyme va greffer en 3' selon la proportion des deux. Selon la littérature (Lars, Inge Larson. 1990) après 1 heure d'incubation à 37°C, une chaîne d'environ 7 nucléotides supplémentaires serait formée (fig.48).

Comme pour les autres marquages ou phosphorylations, il est nécessaire par la suite, de purifier le fragment biotinylé sur spin colonne.

## VIII.2. COURBE DE CONCENTRATION D'ADN CIBLE EN HYBRIDATION SANDWICH

Cette courbe de concentration est réalisée exactement de la même façon que celle réalisée en radioactivité à l'exception du fait que la sonde est biotinylée en 3' et révélée avec le conjugué kinase.

Ce premier essai en bioluminescence ne donne aucun signal significatif. Il n'y a aucune différence entre les différentes concentrations d'ADN cible ni entre les tests spécifiques et non spécifiques. Or, puisque l'expérience homologue en radioactivité nous a montré que l'hybridation sandwich marche bien (voir fig.42b), nous pensons que le problème se situe au niveau de la révélation. Un contrôle positif réalisé en solution avec du conjugué (solution stock diluée de 10 à 2000X) en présence de la mixture réactionnelle et mesuré au luminomètre (Lumac-Hollande) montre pourtant que la pyruvate kinase couplée à la streptavidine est toujours bien active. Le problème viendrait donc d'autre part.

Les hypothèses sont:

- ° la sonde ne serait pas biotinylée ou elle le serait de trop si bien qu'un encombrement stérique empêcherait la reconnaissance de la sonde,
- ° l'hybride long de 414 pb peut se replier sur lui même rendant la biotine inaccessible à la streptavidine,
- ° la streptavidine une fois couplée à la pyruvate kinase (PK) ne reconnaîtrait plus la biotine,
- ° le conjugué étant très gros ( $\pm 300\ 000$  de PM) il y aurait un effet de cinétique important. La rencontre entre le conjugué et la biotine (très petite) se ferait très difficilement,

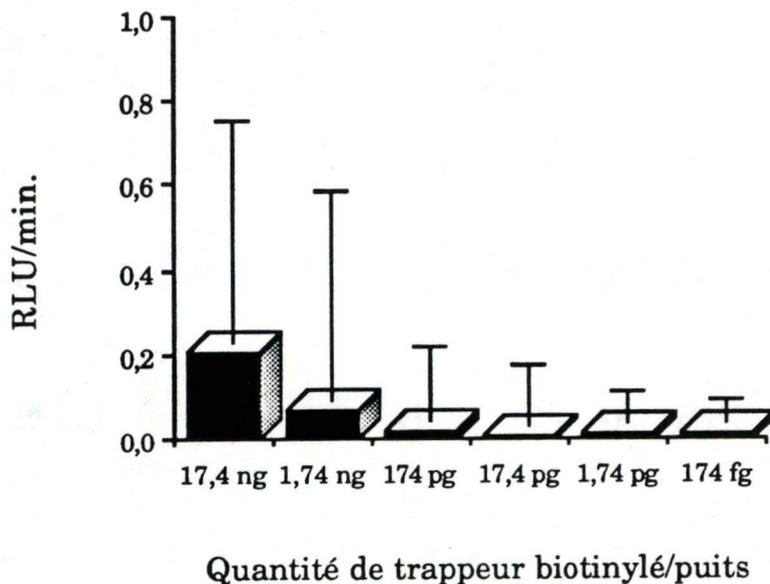


Figure n°49 : Mesure de l'émission de lumière en bioluminescence en fonction de la concentration du trappeur biotinylé fixé dans les puits. La fixation du trappeur biotinylé est suivie d'une incubation de 24 heures avec le conjugué. La luciférase est ensuite ajoutée et la lecture des puits directement effectuée par le luminoskan (une lecture toutes les 30 secondes pendant 20 min). L'unité de mesure est le RLU (relative light unit) / min. Les valeurs reprises sur ce graphe sont les moyennes de quadruples  $\pm 2s$  (écart type).

° il faudrait une certaine accumulation d'ATP avant d'ajouter la luciférase pour voir un signal lumineux détectable au luminoskan.

Pour résoudre cette dernière hypothèse, nous avons repris les mêmes puits et les avons testés dans les conditions suivantes:

Après avoir jeté le mélange réactionnel de l'expérience précédente et avoir rincé les puits au PBS (le conjugué, lui, reste accroché dans les puits), nous avons remis un nouveau mélange réactionnel sans luciférase. Ainsi, pendant 4 heures d'incubation à température ambiante, une certaine quantité d'ATP peut s'accumuler. La luciférase est alors ajoutée et la mesure de la lumière dans chaque puits est immédiatement lue au luminoskan.

A nouveau, les tests n'ont donné aucun signaux significativement plus hauts que les blancs.

Pour essayer de comprendre où se situe le problème, d'autres expériences plus simples ont été réalisées en essayant de détecter en bioluminescence de l'ADN biotinylé directement fixé sur Covalink.

### VIII.3. COURBE DE CONCENTRATION DE TRAPPEUR BIOTYNILE

Quelques expériences ont été réalisées en utilisant le trappeur fixé directement biotinylé et révélé en bioluminescence. Ceci afin d'évaluer l'ordre de grandeur du signal donné pour une quantité de trappeur biotinylé déterminée. Il se peut en effet que l'expérience précédente n'aie pas marché pour une question de concentration de conjugué par rapport à la biotine. Quelques concentrations sont peut-être à optimiser pour obtenir un signal.

Différentes concentrations de trappeurs biotinylés ont été fixées dans les puits par la méthode mise au point au chapitre fixation et ensuite révélées en bioluminescence suivant le protocole initial.

La concentration la plus basse est de 174 fg de fragment de 288 pb, ce qui correspond à 1,8 atomole (am) d'ADN. 1,8 atomole est la quantité qu'il faudrait arriver à détecter car elle correspond à 0,25 pg d'ADN cible de 414 pb.

la détection ne donnant toujours aucun résultats, les puits furent rincés au PBS et remis à incuber avec un mélange réactionnel sans luciférase pendant 24 heures cette fois. Ils furent ensuite révélés par ajout de luciférase après ce long temps d'incubation.

Les valeurs obtenues ne sont toujours pas significativement plus élevées que les blancs (graphe 49).

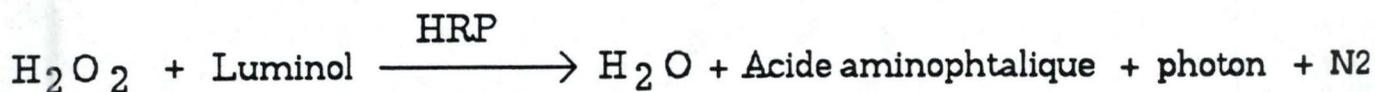


Figure n°50 : Réaction chémoluminescente par la HRP.

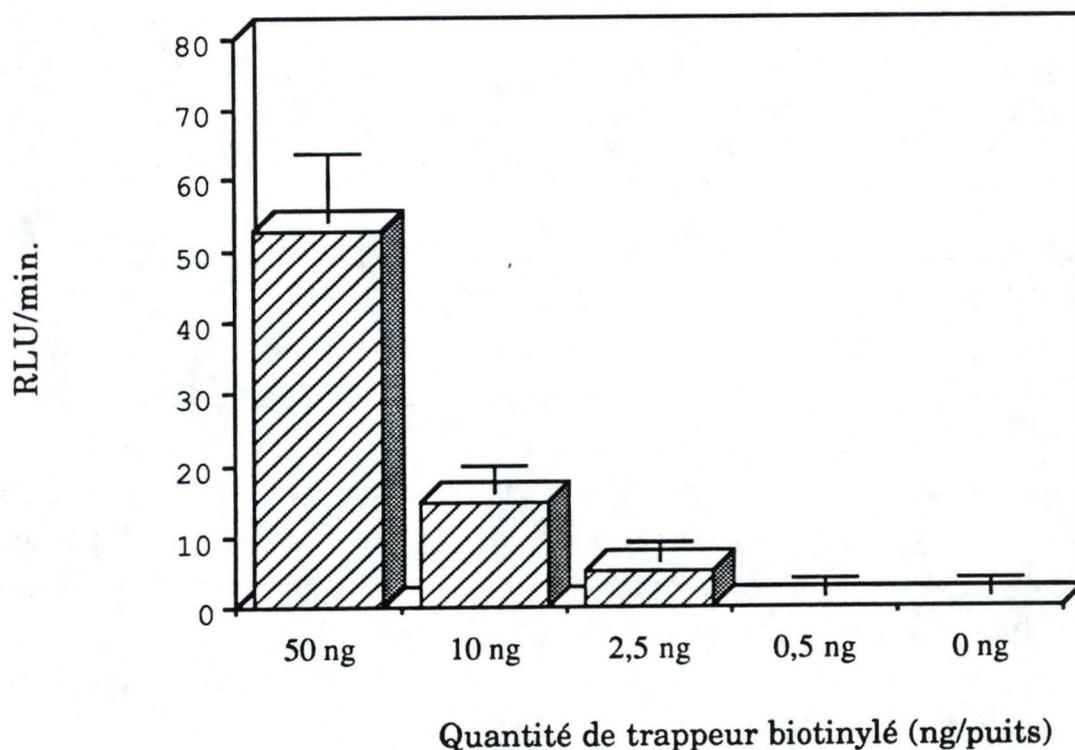


Figure n°51 : Mesure de l'émission de lumière en chémoluminescence en fonction de la concentration du trappeur biotinylé fixé dans les puits. Le conjugué employé est le conjugué avidine peroxydase. L'appareil procède à une lecture des puits toutes les minutes pendant 50 minutes. Contrôle de l'activité du conjugué avidine peroxydase : un échantillon de la solution stock du conjugué dilué 50 fois donne 2477 RLU/min. ± 550. L'unité de mesure est le RLU (relative light unit) / min. Les valeurs reprises sur ce graphe sont les moyennes de quadruplés ± 2s (écart type).

#### VIII.4. ESSAI AVEC LE CONJUGUE AVIDINE - PEROXYDASE

Cet autre type de conjugué nous permet d'étudier la reconnaissance entre la biotine et l'avidine couplée à un enzyme, indépendamment des questions relatives à la bioluminescence.

Une courbe de concentration en trappeur biotinylé et fixé sur le plastique a été réalisée. La révélation s'effectue en chémoluminescence selon le système enzymatique optimisé au laboratoire (fig.50).

Les résultats sont montrés à la figure 51.

Les signaux obtenus sont bien différents des blancs et proportionnels à la concentration d'ADN biotinylé. Nous savons ainsi que :

- ° notre méthode de biotinylation est bonne
- ° Le signal encore faible peut être dû à un problème d'accessibilité de la biotine par l'avidine ou à une quantité trop faible de biotine greffée à la sonde.
- ° la biotine est reconnue par l'avidine couplée à la peroxydase.

Peut-on aussi en dire de même pour la streptavidine couplée à la pyruvate kinase ? En effet, dans ce cas, la reconnaissance pourrait être défavorisée parce que :

- la biotine est à l'extrémité d'une chaîne d'ADN,
- la streptavidine est couplée à un enzyme et que celui-ci étant de PM bien plus grand pourrait entraîner des contraintes stériques qui ne se posent pas, ou moins, avec la HRP.

**PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS**

La technique d'hybridation en sandwich montre, dans les conditions mises au point, une très bonne spécificité ainsi qu'une bonne sensibilité de la détection. D'un point de vue pratique, son seul inconvénient est sa longue durée (20 heures). On pourrait envisager d'écourter le temps d'incubation mais ceci avec deux inconvénients :

\_ Au dépend de la spécificité de la réaction car l'hybridation non spécifique est plus élevée aux courtes durées d'incubation. En ce qui concerne l'hybridation non spécifique de l'ADN cible et sonde aux puits, il est possible de diminuer son importance en procédant à une préhybridation. L'ADN de sperme de saumon (dénaturé et soniqué) ajouté dans la solution de préhybridation saturerait les sites d'accrochage non spécifiques des puits, y empêchant toute fixation de l'ADN cible et sonde. Pour ce qui est de l'hybridation non spécifique d'un ADN autre que *Chlamydia* à la sonde ou au trappeur, nous comptons sur la stringence des lavages pour les éliminer.

\_ Le second désavantage serait un rendement de l'hybridation spécifique plus faible. Moins de sonde biotinylées signifierait une perte de sensibilité du test, à moins d'améliorer le système de révélation de la sonde.

A ce propos, la détection de la sonde peut être améliorée. Cette étape est en fait le facteur limitant de la sensibilité du test et non l'hybridation sandwich. En effet, de très faibles quantités de la séquence cible peuvent être reconnues par la sonde. Le problème est qu'on ne connaît aucun système de révélation capable de mettre en évidence une si faible quantité de sonde.

Afin d'améliorer la révélation de la sonde, quelques perspectives ont été proposées. Le système peut être amélioré - soit au niveau du marquage de la sonde,  
- soit au niveau du conjugué.

La terminale déoxynucléotidyl transférase utilisée pour le marquage à l'extrémité 3' de la sonde, ne marque qu'un nombre restreint de séquences, peut-être même une seule. Elle nécessiterait donc d'être utilisée en très grande quantité (de l'ordre de 3000 U/10 µg d'ADN), soit un enzyme pour chaque brin d'ADN. L'enzyme étant aussi dépendante du cobalt, il faudrait être attentif à ce que celui-ci ne précipite pas au cours de la réaction de marquage.

Un autre recours serait de greffer un plus grand nombre de biotine sur la sonde lors de la PCR la produisant. Il faudrait alors vérifier préalablement que ce grand nombre de biotine n'interfère pas avec l'hybridation sonde biotinylée-ADN cible.

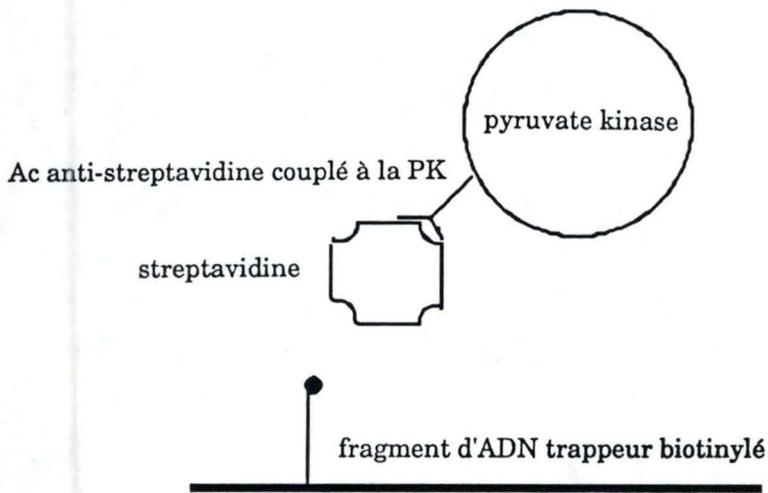


Figure n°53 : Système de détection d'ADN biotinylé utilisant la streptavidine et des anticorps anti-streptavidine couplés à la pyruvate kinase.

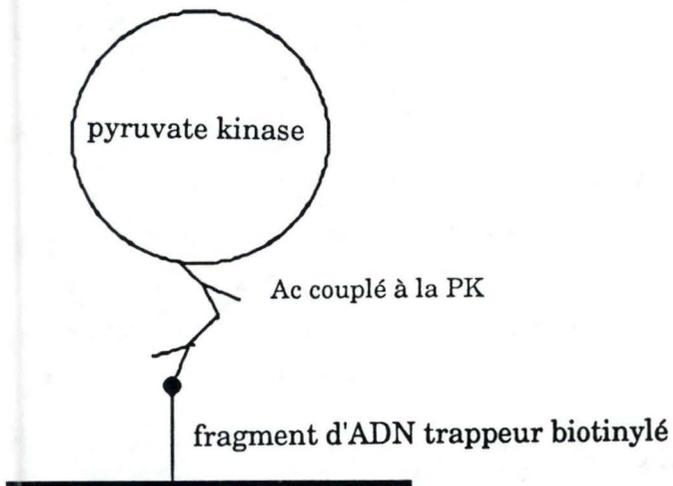


Figure n°52 : Système de détection d'ADN biotinylé utilisant des anticorps anti-biotine et des anticorps couplés à la pyruvate kinase.

Cette étude du marquage de la sonde à la biotine nécessite une méthode de quantification des biotines incorporées. On peut envisager à cet effet, un système utilisant une colonne greffée de (strept)avidine ou d'Ac anti-biotine. La sonde biotinylée d'un côté et marquée radioactivement de l'autre, serait passée sur la colonne. La radioactivité résiduelle de la solution éluée nous renseignerait sur l'efficacité du marquage.

En ce qui concerne l'amélioration du conjugué (streptavidine-pyruvate kinase) On pourrait envisager d'utiliser une autre kinase comme celle de la levure qui a une activité spécifique plus grande, ce qui permettrait une amplification du signal.

Une autre solution serait encore de changer le système de reconnaissance sonde-conjugué. On pourrait envisager une sonde marquée à la fluorescéine reconnue par un Ac anti-fluorescéine accroché à la pyruvate kinase. L'avantage du marquage à la fluorescéine est que cette molécule procurerait elle-même un moyen de vérification directe du marquage de la sonde. D'autres possibilités existent encore comme par exemple l'utilisation d'anticorps anti-biotine pour reconnaître l'ADN biotynilé (fig.52). L'utilisation de streptavidine reconnue par des anticorps anti-streptavidine couplés à la kinase constitue aussi une alternative (fig.53). De plus, ces méthodes pourraient permettre une amplification du signal.

Nous avons pu montrer que l'hybridation en sandwich permettait de détecter des quantités très faibles d'un fragment d'ADN de *Chlamydia trachomatis*. La mise au point de cette détection ayant été faite sur un fragment d'ADN, il serait intéressant maintenant de tester la méthode sur des échantillons cliniques et estimer la sensibilité et la spécificité de la détection.

D'autre part, nous avons utilisé dans ce travail une sonde radioactive. La révélation des sondes froides posent une série de problèmes qui ne permettent pas encore une optimisation de la détection. Leur développement est actuellement en cours pour les mesures quantitatives. Elles permettent d'allier la spécificité et la sensibilité des tests d'hybridation à une utilisation aisée et sans danger dans les laboratoires de recherche et de diagnostics.

**BIBLIOGRAPHIE**

**Black C.M., Barnes R.C., Birkness K.A., Holloway B.P. et Mayer L.W. (1989).**

Nucleotide sequence of the common plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 : use of compatible deletion to generate overlapping fragments.  
Current Microbiol., 16, p 67-74.

**Clyne J.M., Running J.A., Stempien M., Stephens R.S., Akhavan-Tafti H., Schaap A.P. et Urdea M.S. (1989).**

A rapid chemiluminescent DNA hybridization assay for the detection of *Chlamydia trachomatis*.  
J.Bioluminesc.Chemiluminesc., 4, p 357-366.

**Commanducci M., Ricci S. et Ratti G. (1988).**

The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells.  
Mol.Microbiol., 2 (4), p 531-538.

**Commanducci M., Ricci S., Guenini R. et Ratti G. (1988).**

Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with different pathogenicity.  
Plasmid, 23, p 149-154.

**Dean D., Palmer L., Raj Pant C., Courtright P. Falkow S. et O'Hanley P. (1989).**

Use of *Chlamydia trachomatis* DNA probe for detection of ocular *Chlamydiae*.  
J.Clin.Microbiol., 27 (5), p 1062-1067.

- Dulith B., Bébéar C., Taylor-Robinson D. et Grimont P.A.D. (1988)**  
Detection of *Chlamydia trachomatis* by *in situ* hybridization with sulphonated total DNA.  
Ann.Inst.Pasteur/Microbiol., 139, p 115-128.
- Dulith B., Bébéar C., Rodriguez P., Vekris A., Bonnet J. et Garret M. (1989)**  
Specific amplification of a DNA sequence common to all *Chlamydia trachomatis* serovars using the polymerase chain reaction.  
Res.Microbiol., 140, p 7-16.
- Dulith B., Bébéar C. et Grimont P.A.D. (1990)**  
Detection of *Chlamydia trachomatis* with DNA probes.
- Eggerding F.A., Peters J., Lee R.K. et Inderlied C.B. (1991).**  
Detection of *Rubella* virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplify DNA.  
J. Clin. Microbiol., 29(5), 945-952.
- Gratton C.A., Lim-Fong R., Prasod E. et Kibsey P.C. (1990).**  
Comparison of a DNA probe with cell culture for detecting *Chlamydia trachomatis* directly from genital specimens.  
Mol.Cell.Probe, 4, p 25-31.
- Hatt C., Ward M.E. et Clarke J.N. (1988).**  
Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication.  
Nucl. Acids Res., 16 (9), p 4053-4067.
- Inouye, S., et Hondo, R. (1990).**  
Micro plate hybridization of amplified viral DAN segment.  
J. Clin. Microb. 28 (6), 1469-1472.

**Keller G.H., Huang D., et Manak M.M. (1989).**

A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA.

Anal. Biochem. 177, 27-32.

**Kluytmans J.A.J.W., Niesters H.G.M., Mouton J.W. et Quint W.G.V. (1991).**

Performance of a nonisotopic DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens.

J.Clin.Microbiol., 29 (12), p 2685-2689.

**Kricka L.J. (1991)**

Chemiluminescent and bioluminescent techniques.

Clin.Chem., 37 (9), p 1472-1481.

**Leback P. (1987)**

Spécifiques, sensibles et inoffensives : voici les sondes nucléiques non-radioactives.

Biofutur, 11, p 12-18.

**Le bar W., Herschman B., Jemal C. et Pierzchola J. (1990)**

Comparison of DNA probe, monoclonal antibody enzyme immunoassay and cell culture for the detection of *Chlamydia trachomatis*.

J.Clin.Microbiol., 27 (5), p 826-828.

**Lund V., Schmid, R., Rickwood, D. et Hornes, E. (1988).**

Nucleic Acids Res. 16, 10,861-10,880.

**Mercer L.J., Robinson D.C., Sahn D.F., Lawrie M.J. et Hajj S.N. (1990).**

Comparison of chemiluminescent DNA probe to cell culture for the screening of *Chlamydia trachomatis* in gynecology clinic population.

Obstet.Gynecol., (1), p 114-117.

**Merz B. (1987)**

DNA probes promise to transform diagnosis of infectious disease.

Med.News.Perspectives, 258 (3), p 301-302.

**Neman-Simka V., Delmos-Beauvieux M.C., Geniaux M et Bébéar C. (1991)**

Evaluation of chemiluminometric immunoassay and a direct immunofluorescence test for detecting *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens.

Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 10 , p,????

**Nicolas J.C., Térouanne B., Balaguer P., Boussioux A.M. et Crastes de Paulet A. (1990)**

Une phase solide bioluminescente pour les dosages immunologiques et la détection de sondes nucléiques.

Ann.Biol.Clin., 190 (48), 573-578.

**Ostergaard L., Birkelund S. et Christiansen G.(1990)**

Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*.

J. Clin.Microbiol., 28 (6), p.1254-1260.

**Palmer L. et Falkow S. (1986).**

A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*.

Plasmid, 16, p 52-62.

**Palva A., Nyberg K., et Palva I. (1988).**

Quantification of  $\alpha$ - amylase mRNA in *Bacillus subtilis* by nucleic acids sandwich hybridization.

Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. 7 (2) 135-142.

**Paul I.D. et Caul E.O. (1990).**

Evaluation of three *Chlamydia trachomatis* immunoassays with an unbiased, non invasive clinical sample.

J.Clin.Microbiol., 28 (2), p 220-222.

**Peterson E.M., Markoff B.A., Schachter J. et De la Maza L. (1990)**

The 7.5 kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism.

Plasmid, 23, p 144-148.

**Saiki R.K., Gyleensten U.B. et Erlich H.A. (1988).**

The polymerase chain reaction.  
Genome analysis. A practical approach.  
IRL Press .

**Saiki R.K., Walsh P.S. Levenson C.H. et Erlich H.A. (1989).**

Genetic analysis of amplify DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes.  
Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 86, 6230-6234.

**Scully S.P., Joyce M.E., Abidi N. et Bolander M.E. (1990)**

The use of polymerase chain reaction generated nucleotide sequences as probes for hubridization.  
Mollecular and cellular probes. 4, 485-595.

**Sriprakash K.S. et Macavoy E.S. (1987).**

Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*.  
Plasmid, 18, p 205-214.

**Terpstra W.J., Schoone G.J. et Ligthart G.S. (1987).**

Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin labelled DNA probes.  
J.Gen.Microbiol., 133, p 911-914.

**Wolcott M.J. (1992)**

Advances in nucleic acid-based detection methods.  
Clin.Microbiol.Reviews, 5 (4), p 370-386.

**Yang L.I., Panke E.S., Liest P.A., Fry R.J. et Lee R.F. (1991)**

Detection of *Chlamydia trachomatis* endocervical infection in asymptomatic and symptomatic women : comparison of deoxyribonucleic acid probe test with tissue culture.  
Am.J.Obstet.gynecol., 165 (5), p 1444-1453.

**Brevet n° EP 09200827**

Conjugué destiné à la détection et/ou dosage d'un composé biologique

**Brevet n° EP 0183383 A1 (1986).**

Detection of *Chlamydia trachomatis*.

**Brevet n° EP 0366 412 A2 (1989).**

Synthetic oligonucleotide useful for the detection of *Chlamydia trachomatis*.

**Brevet n° WO 90/15159 (1990).**

Nucleic acid probes for the detection of *Chlamydia trachomatis*.