



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'une méthode de dosage en chémoluminescence utilisant une sonde à ADN

ZAMMATTEO, Nathalie

Award date:
1990

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.

750 690

Laboratoire de biochimie cellulaire

Promoteur : Prof. J.Remacle

Mise au point d'une méthode
de dosage en chémoluminescence
utilisant une sonde à ADN

Nathalie
ZAMMATTEO

Année 1989-1990

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tel. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Mise au point d'une méthode de dosage en chémoluminescence
utilisant une sonde à ADN

ZAMMATTEO Nathalie

Résumé

On sait actuellement mettre en évidence des acides nucléiques viraux dans les cellules d'un organisme infecté par utilisation de sondes à acides nucléiques. Le principe de la détection est simple : les sondes nucléiques sont marquées (radioactivement ou à froid), puis on procède à leur hybridation avec la séquence cible de l'agent pathogène à détecter. Les marqueurs radioactifs présentent de nombreux inconvénients et on préfère utiliser des marqueurs faisant intervenir des systèmes enzymatiques, les enzymes étant révélés par colorimétrie ou par luminescence. L'avantage de la luminescence est la grande sensibilité de la méthode et de la facilité de sa mise en oeuvre.

Dans ce travail nous avons détecté une séquence ARNm d'histone H4 à l'aide d'une sonde biotinylée, l'hybride étant révélé par de l'avidine marquée à la peroxydase.

La peroxydase a été révélée en colorimétrie et en chémoluminescence.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : J. Remacle

Bientôt le 15 juin, l'année se termine, elle a si vite passé.
Une année de travail dont le résultat suit ces quelques lignes et au cours de laquelle j'ai eu la chance de côtoyer des gens formidables. C'est pourquoi je voudrais tous vous remercier pour l'aide que vous m'avez apportée, pour votre compétence et vos sourires.
Tout d'abord vous Monsieur Remacle, pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et guidée tout au long de l'année. Je vous remercie pour votre haute compétence scientifique, votre compréhension, vos idées géniales dont vous détenez le secret.
Marc, je te remercie de m'avoir fait connaître la bioluminescence. Merci de m'avoir suivie au cours de mes expériences et de n'avoir jamais manqué à aucun de mes appels.
Merci à toi Isabelle qui m'a fait découvrir la HRP pour ton sourire et ta bonne humeur.
Marie-Denise, je te remercie pour ton soutien et ton aide tout au long de l'année et plus particulièrement à la fin de ce travail quand tout allait mal.
Un merci tout particulier à Monsieur Lourtie qui a mis à ma disposition un travail de recherche sur les sondes nucléiques. Je voudrais également remercier toute l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire pour leur compétence, leur aide et leur sympathie.
Je voudrais aussi remercier Edouard pour son inlassable dévouement et sa sympathie.
Merci à toi Andrée de m'avoir appris à travailler stérilement, merci aussi pour ta gentillesse et ta compréhension lorsque je monopolisais les ciseaux.
Je remercie également Bobo et Marc d'avoir bien voulu partager un coin de bureau et d'avoir supporté mon désordre et mes crises de folie.
Je pense aussi à Marie, merci pour ton sourire et ta gentillesse. Je remercie aussi Pierre, Marc, Etienne, Edouard, Thierry, Olivier, Maggi pour leur humour et leur bonne humeur.

Je voudrais à présent remercier Martine, Véronique, Manoëlle, Anne, Christine, Eric, Etienne, Gégé, Vincent, Thérèse, Isabelle, Françoise, Carine, pour leur sympathie.

Merci à toi Benoît de m'avoir fait connaître le Mac.

Je remercie tout particulièrement Théodora pour tous les événements que nous avons vécus ensemble depuis le début de ces études; merci pour ta gentillesse, ton aide et ta compréhension.

Je voudrais aussi remercier mes parents de m'avoir permis d'entreprendre ces études et de m'avoir soutenue tout au long de celles-ci.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

CHAP. I GENERALITES

I.A. La sonde nucléique

I.A.1. Introduction

I.A.2. Définition d'une sonde nucléique

I.A.3. L'hybridation des sondes avec leur séquence complémentaire

I.A.1.1. Dénaturation

I.A.1.2. Renaturation

I.A.4. Conditions d'hybridation des sondes

I.B. Les différentes méthodes d'hybridation

I.B.1. Hybridation sur dot blot

I.B.1.1. Principe

I.B.1.2. Réalisation

I.B.2. Hybridation par Southern blot

I.B.2.1. Principe

I.B.2.2. Problèmes rencontrés

I.B.2.3. Circonscriptions des problèmes

I.B.3. Hybridation in situ

I.B.3.1. Principe

I.B.3.2. Réalisation

I.B.3.3. Intérêt

I.B.4. Hybridation en solution

I.B.4.1. Intérêt

I.B.4.2. Les modes d'amplification

I.C. Les stratégies d'hybridation

I.C.1. Hybridation sur support solide

I.C.1.1. Sur support

I.C.1.2. En sandwich

I.C.2. Hybridation en solution

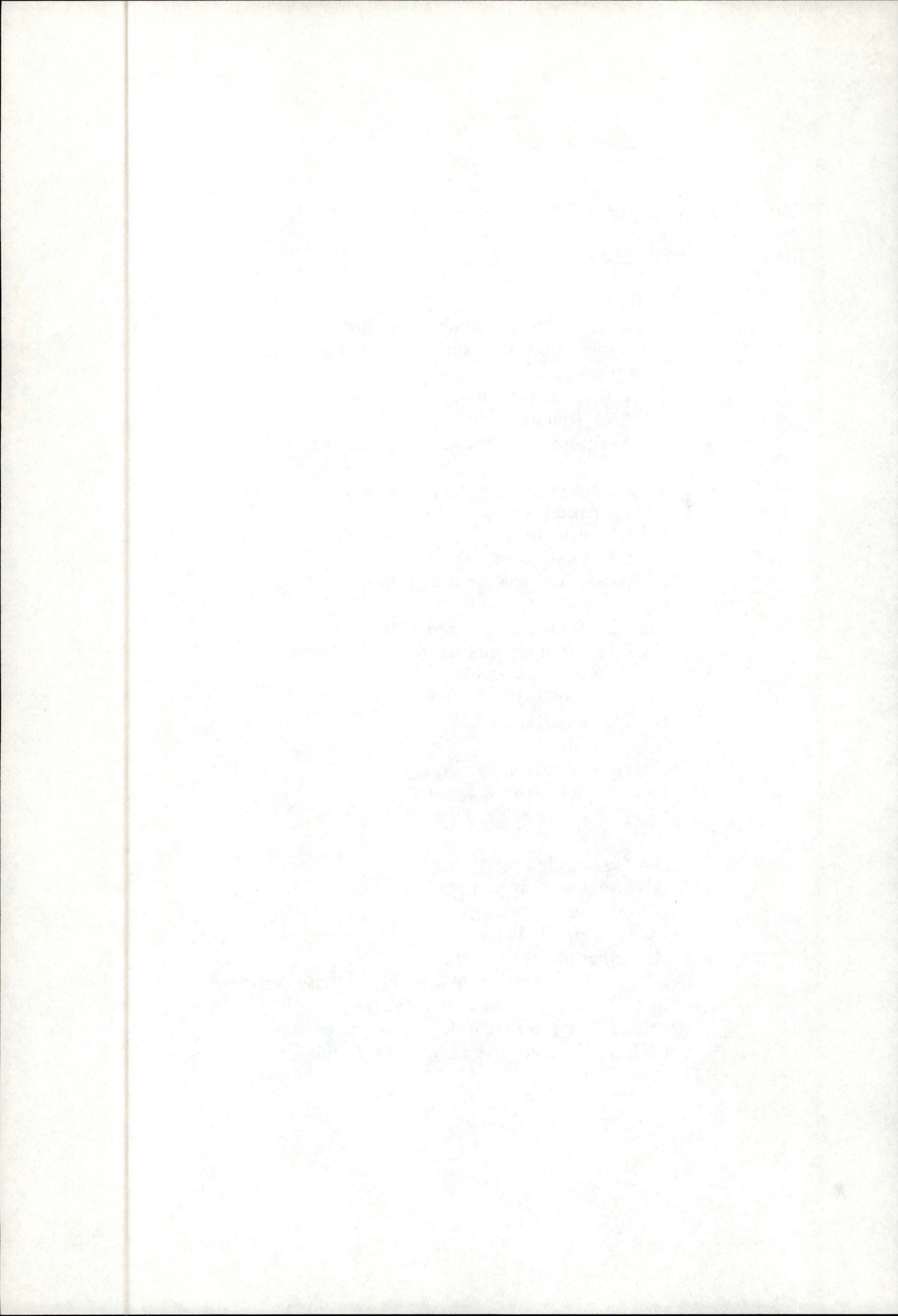
I.C.2.1. Capture des hybrides en phase solide

I.C.2.2. Les systèmes homogènes

I.C.2.3. Test utilisant le déplacement des brins

I.C.2.4. Utilisation d'agents "crosslink"

I.C.3. Conclusion



I.D. Les différents systèmes de marquage des sondes

I.D.1. Les sondes radioactives

I.D.1.1. Les sondes plasmidiques double brin

I.D.1.2. Les sondes simple brin

I.D.1.3. Technique en Sandwich

I.D.1.4. Les sondes oligonucléotidiques

I.D.1.5. Les sondes à ARN

I.D.1.6. Conclusion

I.D.2. Les sondes froides

I.D.2.1. Intérêt pratique

I.D.2.2. Intérêt diagnostic

I.D.2.3. Les différentes techniques de marquage à froid

I.D.2.3.1. Les liens non covalents

I.D.2.3.2. Les liens covalents

-Activation chimique de marqueurs azides

-Réaction photochimique de cycloaddition

-Mercuration

-Transamination des cytosines

-Substitution des amines

-Formation de ponts disulfures

-Incorporation de biotine par nick translation

-Alternative à la nick translation

-Incorporation de résidus glycosylés

-Incorporation d'un promoteur LAC

-Marquage à l'extrémité 3'

-Activation de la guanine

I.E. les stratégies de détection de la sonde marquée

I.E.1. Introduction

I.E.2. La détection indirecte

I.E.2.1. Le système avidine-biotine

I.E.2.2. Le système du 5-BdUI de PASTEUR

I.E.2.3. Le système des sondes sulfonées de ORGENICS

ltd

I.E.2.4. Le système des sondes à la digoxine de

BOEHRINGER-MANNHEIM

I.E.3. La détection directe

CHAP. II MATERIELS ET METHODES

II.A. Dosage de la HRP en chémoluminescence

II.A.1. Principe

II.A.2. Matériel

II.A.3. Méthode

II.B. Couplage de la HRP à la biotine

II.B.1. Matériel

II.B.2. Méthode

II.C. Couplage de la HRP à l'avidine

II.C.1. Principe

II.C.2. Matériel

II.C.3. Méthode

II.D. Couplage de la biotine à des IgG

II.D.1. Matériel

II.D.2. Méthode

II.E. ELISA

II.E.1. Principe

II.E.2. Matériel

II.E.3. Méthode

II.E.3.1. Détermination des concentrations en conjugués
à utiliser pour le dosage ELISA

II.E.3.2. ELISA proprement dit

II.F. Hybridation de la sonde biotinylée

II.G.1. Principe

II.G.2. Matériel

II.G.2.1. Isolation des ARN

II.G.2.2. Electrophorèse en gel dénaturant

II.G.2.3. Transfert sur nitrocellulose

II.G.2.4. Hybridation

II.G.2.5. Révélation

II.G.3. Méthode

II.G.3.1. Isolation des ARN

II.G.3.2. Electrophorèse en gel dénaturant

II.G.3.3. Transfert sur nitrocellulose

II.G.3.4. Hybridation

II.G.3.5. Révélation

CHAP. III RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.A. Dosage de la HRP en chémoluminescence

III.A.1. Présentation de l'enzyme

III.A.1.1. Caractéristiques

III.A.1.2. Mécanismes de la réaction

III.A.2. Essais préliminaires de dosage

III.A.2.1. Courbe de concentration en HRP

III.A.2.1.1. Matériel

III.A.2.1.2. Méthode

III.A.2.1.3. Résultats

III.A.2.2. Courbe de concentration en H₂O₂

III.A.2.2.1. Matériel

III.A.2.2.2. Méthode

III.A.2.2.3. Résultats

III.A.2.3. Courbe de concentration en luminol

III.A.3. Mise au point du dosage de la HRP en chémoluminescence

III.A.3.1. Matériel

III.A.3.2. Détermination du profil d'émission de la lumière

-Méthode

-Résultats

III.A.3.3. Sensibilité du dosage de la HRP en chémoluminescence

III.A.3.3.1. Méthode

III.A.3.3.2. Résultats

III.A.3.4. Comparaison de la sensibilité du dosage de la HRP en chémoluminescence et en spectrophotométrie

III.A.3.4.1. Matériel

III.A.3.4.2. Méthode

III.A.3.4.3. Résultats

III.A.3.5. Amélioration de la sensibilité du dosage en chémoluminescence

III.A.3.5.1. Dissolution du luminol dans du DMSO

-Matériel

-Méthode

-Résultats

III.A.3.5.2. Amplification du signal par un Enhancer

-Introduction

-Matériel

-Méthode

-Résultats

III.A.3.5.3. Stabilisation de la HRP et utilisation d'un Enhancer

- Matériel
- Méthode
- Résultats

III.A.3.5.4. Comparaison de la sensibilité du dosage en spectrophotométrie et en chémoluminescence

III.B. Mise au point du système de détection

III.B.1. Fixation de la HRP sur la sonde

III.B.2. Fixation de la HRP sur une sonde biotinylée

III.B.2.1. Principe

III.B.2.2. Fixation de la biotine sur la HRP

III.B.2.3. Résultats

III.B.3. Fixation de HRP couplée à l'avidine sur une sonde biotinylée

III.B.3.1. Couplage de la HRP à l'avidine

-Profil des pics

-Calcul des PM correspondants aux produits

-Calcul du rendement de couplage

III.B.3.2. ELISA

-Principe

-Couplage IgG-biotine

-Courbe de concentration en conjugués

-ELISA proprement dit

III.C. Marquage de la sonde

III.D. Hybridation de la sonde biotinylée avec l'ARNm complémentaire

III.D.1. Principe

III.D.2. Standardisation du système de détection

III.D.2.1. Méthode

III.D.2.2. Résultats

III.D.3. Contrôle de l'efficacité de la sonde biotinylée

III.D.3.1. Méthode

III.D.3.2. Résultats

III.D.4. Dot blot

III.D.4.1. Méthode

III.D.4.2. Résultats

III.D.5. Northern blot

III.D.5.1. Méthode

III.D.5.2. Résultats

CHAP. IV PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

CHAP. V BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

- Abs : absorbance
- ABTS : Azinobis éthylbenzthiazoline Sulfonic acid
- Ac : anticorps
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADP : adénosine diphosphate
- Ag : antigène
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- ARNr : ARN ribosomique
- ATP : adénosine triphosphate
- avid. : avidine
- biot. : biotine
- DAB : diamino benzidine
- DMSO : diméthyl sulfoxyde
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbant Assay
- HRP : Horse Radish Peroxydase
- HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
- IgG : immunoglobuline
- μ g : microgramme
- mg : milligramme
- μ l : microlitre
- ml : millilitre
- mol : molaire
- mmol : millimolaire
- ng : nanogramme
- PBS : Phosphate Buffer saline
- PM : Poids Moléculaire
- PPP : Para-PhénylPhénol
- RLU : Relative Light Unit
- SAB : Sérum Albumine Bovine

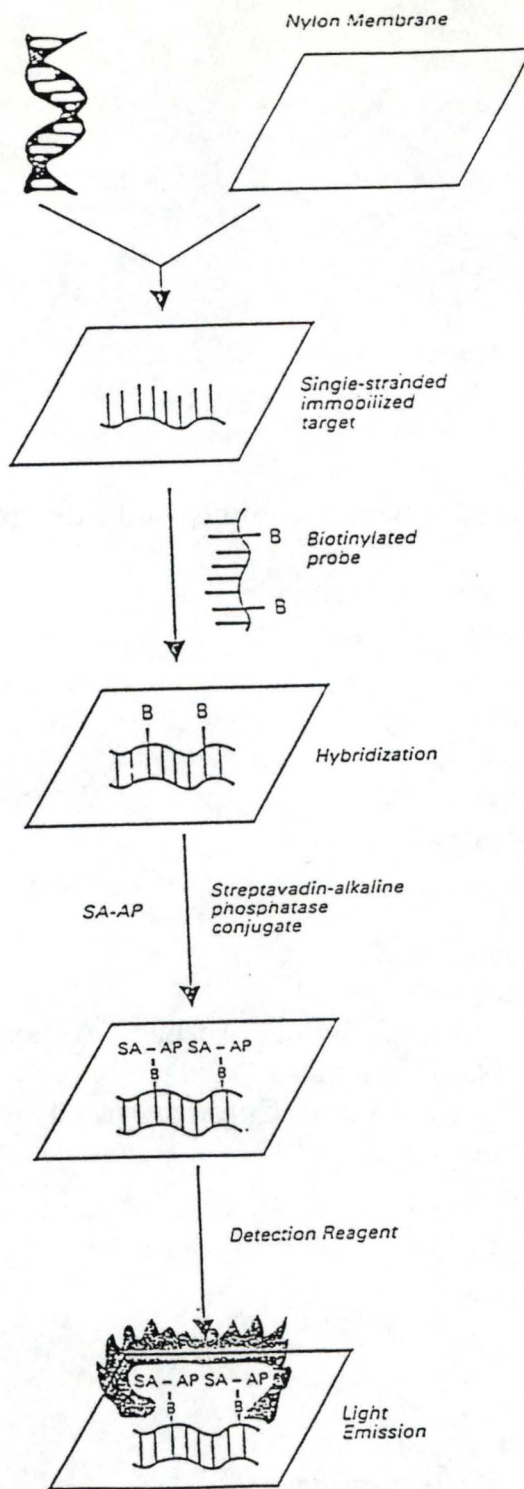


Fig. 1 : Principe de la détection des sondes nucléiques en chémoluminescence. (GIBCO BRL).

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plusieurs décennies, les cultures cellulaires ont permis la reconnaissance et l'identification de très nombreux virus, permettant dans un second temps leur association à un syndrome clinique et l'élaboration de vaccins efficaces.

Les agents pathogènes sont identifiés par leur croissance, leurs propriétés métaboliques ou leurs caractères structuraux.

Ces caractères résultent en fait de la présence d'antigènes, d'enzymes et d'autres protéines qui sont l'expression d'une information contenue dans le noyau (ADN).

On sait actuellement mettre en évidence des acides nucléiques viraux dans les cellules d'un organisme infecté par l'utilisation de sondes à acides nucléiques.

Les sondes sont des séquences d'ADN complémentaires d'une partie du génome des agents pathogènes.

Le principe de la détection est simple (Bricout 1988) : les sondes à acides nucléiques sont d'abord marquées soit avec des isotopes radioactifs, soit avec des marqueurs froids (non radioactifs). Puis on procède à l'hybridation de ces sondes avec la séquence cible de l'agent pathogène à détecter. Le marqueur est ensuite révélé.

Les différentes méthodes d'hybridation, de marquage et de révélation de ces sondes seront décrites au chapitre I.

Une des limitations de l'utilisation des sondes à acides nucléiques est leur sensibilité.

Les systèmes de détection existants sont la révélation de sondes marquées soit soit froides soit radioactives et faisant intervenir des systèmes enzymatiques, les enzymes étant révélés par colorimétrie ou par luminescence.

Le but de ce travail consiste en la mise au point d'un système de détection de sonde à acides nucléiques en chémoluminescence.(fig 1)

Nous avons choisi ce mode de détection du fait de sa grande sensibilité et de la facilité de sa mise en oeuvre.

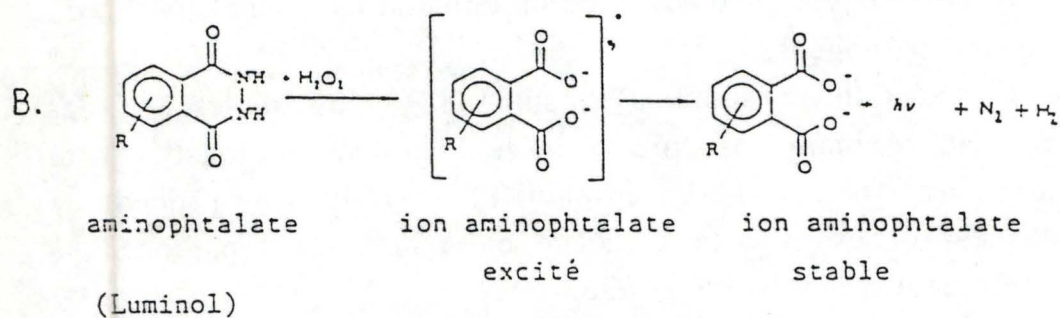
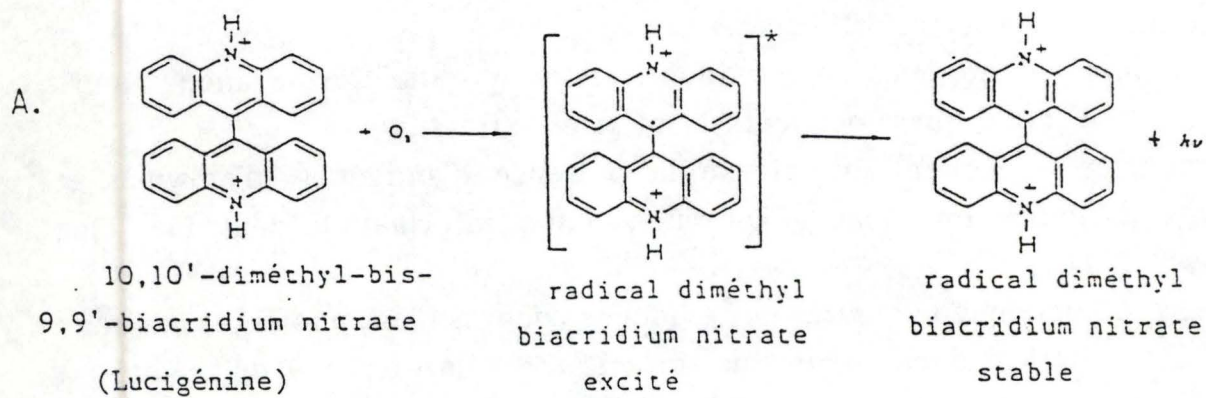


Fig. 2 : Mécanisme de la production de lumière (chémoluminescence) de la lucigénine (A) et du luminol (B).
D'après DELUCA 1978.

Généralités sur la chémoluminescence

Certaines molécules, lorsqu'elles sont exposées à diverses sources d'énergie (chaleur, radiations, réactions chimiques,...), emmagasinent cette énergie et passent de ce fait dans un état énergétique instable.

Le retour à un état stable se fait en libérant l'énergie reçue, et ceci de différentes manières, l'une d'entre elles étant d'utiliser l'énergie excédentaire pour émettre un rayonnement visible. (Schram 1981).

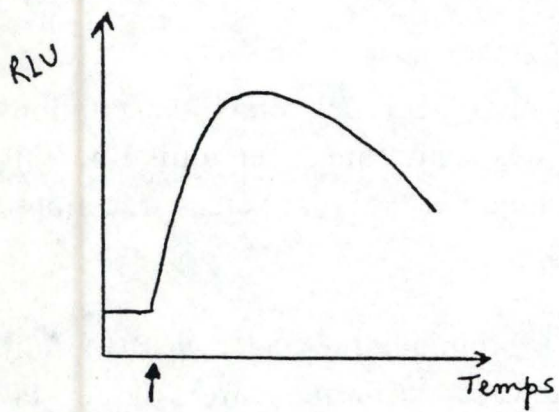
Les procédés par lesquels des molécules atteignent des états d'excitation hauts en énergie par le biais de réactions chimiques, et qui libèrent ensuite cette énergie en émettant de la lumière, sont appelées réactions chémoluminescentes ou bioluminescentes.

La chémoluminescence se distingue de la bioluminescence par le fait que les espèces excitées sont de nature chimique alors que la bioluminescence implique également des molécules biologiques (luciférases).

La plupart de ces réactions en chémoluminescence sont des réactions d'oxydation. Celles-ci provoquent la libération d'une grande quantité d'énergie pour chaque molécule oxydée, ce qui permet l'émission de lumière. Les molécules oxydantes sont principalement l' H_2O_2 et le radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$). Les molécules oxydées sont le plus souvent la lucigénine ou le luminol (fig. 2).

Principe de détection des rayons lumineux : le luminol ou lucigénine, après avoir été excités par H_2O_2 ou $\text{O}_2\cdot^-$, retombent à leur état énergétique de base en émettant un photon qui peut être capté par un photomultiplicateur ou luminomètre. Celui-ci permet de transformer le signal lumineux en signal électrique. La grande sensibilité de la détection des photons provient de ce système d'amplification. Le luminomètre est relié à un appareil enregistreur qui permet de visualiser à tout moment la cinétique de production du signal lumineux. Le signal enregistré peut être de deux types (fig.3).

(a)



(b)

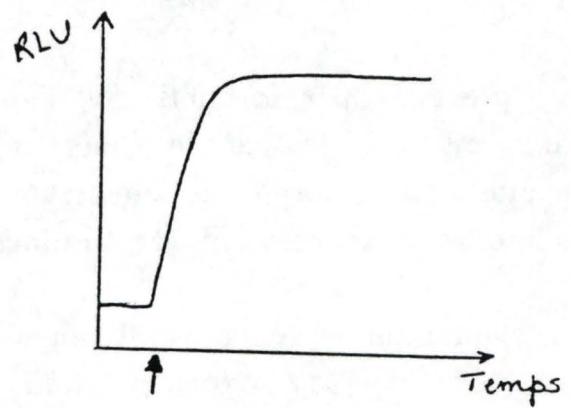


Fig. 3 : Cinétique de production du signal lumineux en fonction du temps (explication dans le texte). Le signal est intégré au cours du temps et est exprimé en RLU (relative light unit).

Dans les deux cas, on obtient un maximum d'intensité lumineuse plus ou moins rapidement. Ce maximum est suivi soit d'une diminution du signal (a), soit d'un signal qui reste constant pendant un temps relativement long (b).

Il est important de savoir que le signal enregistré est directement proportionnel au nombre de photons émis. (Doye A., 1987)

a) soit la réaction $A + B \text{ -----} \rightarrow C + D + h\nu$

où B est présent en excès,

où A est ajouté à l'échantillon pour démarrer la réaction.

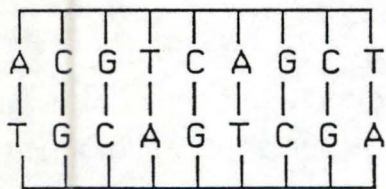
La réaction va se déplacer vers la droite avec une vitesse dépendant notamment de la quantité de A présent et donnant un certain signal lumineux. Dès lors la quantité de réactifs va décroître. La diminution de A va ralentir la vitesse de réaction et par conséquent le nombre de photons enregistrés...d'où l'allure du signal.

(b) Un signal constant peut être théoriquement obtenu, si l'on parvient à établir des conditions telles que l'enzyme catalyseur de la réaction ne puisse agir que lentement par rapport aux quantités de substrats. Cela est rendu possible par exemple en inhibant partiellement l'enzyme.

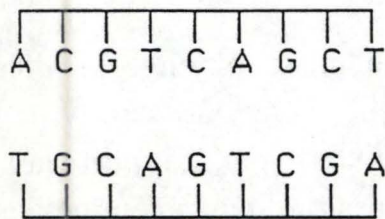
Après une revue bibliographique abordant en toute généralité les différents modes d'hybridation, de marquage et de détection des sondes nucléiques, on examinera successivement les résultats obtenus sur l'optimalisation du dosage de la peroxydase (HRP) en chémoluminescence (I), la mise au point du système de détection (II), le marquage de la sonde (III) et son hybridation (IV).

Nous avons testé l'efficacité du système de détection en l'utilisant pour la détection d'antigènes dans un système "enzyme immunoassays".

Le type d'immunoassay utilisé est un ELISA (enzyme linked immunosorbant assay), de type sandwich.



↑
 augmentation brusque
 de la température
 ↓



rupture des liens hydrogènes
 et séparation des deux chaînes
 complémentaires

Fig. 4 : Dénaturation du DNA par chauffage.

A = adénine; C = cytosine; G = guanine; T = thymine.

CHAP. I. Généralités

A. La sonde nucléique et l'hybridation

1. Introduction

On sait actuellement mettre en évidence des acides nucléiques viraux dans les cellules d'un organisme infecté grâce à l'emploi des sondes nucléiques.

Les travaux concernant les sondes nucléiques pour l'identification d'agents pathogènes, sont de plus en plus nombreux. (Pour une revue, Bricout, 1988).

2. Définition d'une sonde nucléique

Une sonde est une séquence d'ADN ou d'ARN simple brin capable sous certaines conditions expérimentales de retrouver sa séquence complémentaire et de s'hybrider avec elle pour former un duplex stable.

3. L'hybridation des sondes avec leur séquence complémentaire

1) Dénaturation du DNA ou du RNA à analyser (fig. 4)

Après purification de l'ADN ou de l'ARN à partir de l'échantillon biologique, il est nécessaire de le préparer à l'hybridation.

Cette préparation est en fait une dénaturation.

La dénaturation a lieu lorsqu'il y a rupture des ponts hydrogènes impliqué dans la formation des structures secondaires des acides nucléiques (structure en double hélice pour l'ADN et structure en épingle à cheveux pour l'ARN).

Pour cela, il suffit de chauffer la préparation à une température supérieure à la température de fusion ou "melting temperature" (TM). La température de fusion est la température à laquelle 50 % des brins sont dissociés.

2) Renaturation et hybridation moléculaire

La renaturation est obtenue par refroidissement lent de la préparation d'acides nucléiques au cours duquel les chaînes désappariées se réunissent formant ainsi des structures secondaires identiques à celles de l'ADN ou de l'ARN natif. La renaturation s'explique par la complémentarité des bases.

4 Conditions d'hybridation des sondes

Lors de l'hybridation, deux brins d'acide nucléique vont s'associer. Cette association dépend fortement des conditions expérimentales (Durand 1988).

Les paramètres pouvant influencer la vitesse d'association sont :

-la température : elle doit être inférieure à la température de fusion (TM).

-la force ionique (m) : son influence est moindre si la concentration en sels reste inférieure à 0,4 mol/l en NaCl

-la longueur des brins, leur complexité et leur concentration : la vitesse de réaction est d'autant plus grande que la complexité est faible et que la concentration est élevée.

-le pH : il influence peu s'il reste maintenu entre 5 et 9,15

-certains adjuvants comme le sulfate de dextran, augmentent le taux d'hybridation réel en augmentant la concentration apparente de la sonde.

Lorsque l'hybridation est réalisée, il faut encore stabiliser l'hybride formé et uniquement celui qui s'associe parfaitement à la séquence cible. Pour cela, on joue sur différents paramètres, principalement la température et la force ionique.

Enfin lorsque l'hybridation est réalisée, il faut la détecter, c'est pourquoi on applique aux sondes des marqueurs qui permettront de les révéler après hybridation.

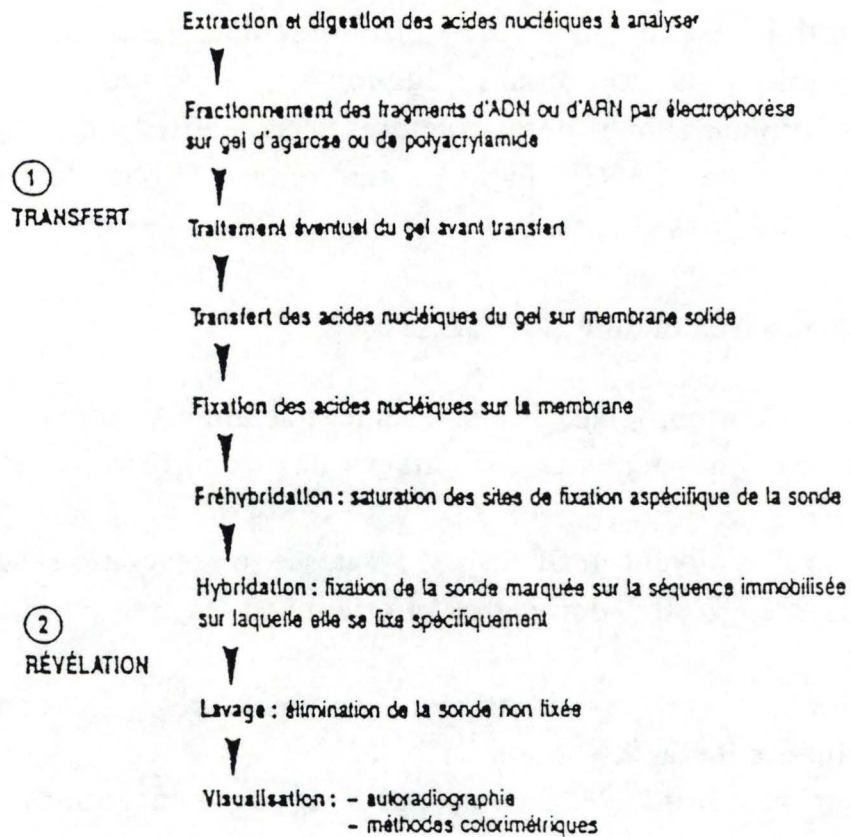


Fig. 5 : Principe du transfert des acides nucléiques sur un support solide par la technique de Northern blot.

B. Les différentes méthodes d'hybridation

La technique utilisée est en rapport avec la nature de l'échantillon à analyser.

1. L'hybridation sur dot blot

1° Principe :

cette méthode permet de concentrer l'échantillon sur une membrane (nitrocellulose ou nylon).

2° Réalisation :

Les cellules à analyser sont lysées avec un détergent puis le lysat est passé sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon à l'aide d'un appareil de filtration.

L'ADN fixé sur le filtre est débarrassé de sa gangue protéique par traitement à la protéinase K. L'hybridation est réalisée dans une enveloppe en plastique contenant la sonde marquée à laquelle on ajoute le filtre porteur de l'échantillon à analyser.

3° Intérêt

L'hybridation étant réalisée sur un support solide (filtre), on peut aisément séparer la sonde en excès de l'hybride formé par simple lavage.

Cette méthode permet de concentrer l'échantillon par filtration, elle est donc particulièrement intéressante pour des échantillons de faible concentration en matériel nucléaire.

2. Hybridation par southern blot

1° Principe

On a ajouté à la technique de dot blot une étape supplémentaire. Il s'agit d'un fractionnement des acides nucléiques par électrophorèse suivi d'un transfert des brins séparés du gel sur un support solide (fig. 5).

L'ADN à analyser est digéré par des enzymes de restriction avant d'être fractionné par électrophorèse sur un gel d'agarose (Durand, 1988).

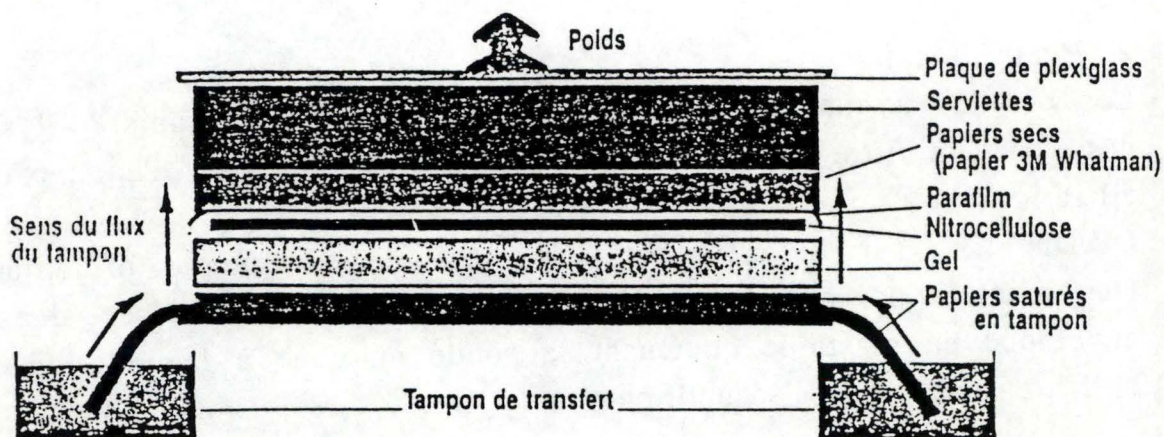


Fig. 6 : Appareillage pour le transfert des acides nucléiques sur un filtre de nitrocellulose.

Le transfert sur un support solide est réalisé en faisant monter un tampon par capillarité à travers le gel (fig. 6). Les fragments d'ADN entraînés par le tampon sortent du gel et sont piégés dans les fibres du filtre. On obtient donc un support solide qui est la réplique exacte du profil électrophorétique des fragments d'ADN dans le gel.

On procède ensuite à la fixation irréversible de l'ADN sur le filtre par cuisson à 80°C pendant 2 h pour un filtre de nitrocellulose et par exposition quelques min aux UV pour un filtre de nylon.

On procède ensuite de la même manière que pour le dot blot.

2° Problèmes rencontrés

-Problèmes techniques :

-Préhybridation du filtre

Avant l'hybridation, il est nécessaire de préhybrider le filtre afin de saturer les sites non spécifiques sur lesquels la sonde pourrait se fixer et occasionner ainsi un bruit de fond gênant.

La solution de préhybridation est en fait la solution d'hybridation sans la sonde.

-Non homogénéité du transfert

Les fragments de taille supérieure à 10 Kb restent emprisonnés dans le gel et ceux de taille inférieure à 500 pb traversent le filtre.

-Problèmes de support :

Les membranes de nitrocellulose sont fragiles surtout après cuisson et ne sont plus réutilisables. De plus, cette technique n'est pas applicable au transfert des ARN (ils ne sont pas retenus par la nitrocellulose).

3° Circonscription des problèmes

-Amélioration de l'homogénéité du transfert :

on procède à une réduction de la taille des gros fragments à l'intérieur du gel par fragmentation chimique ou aux UV.

-Amélioration de la rapidité et de l'efficacité du transfert :

a) Utilisation de membranes plus performantes comme le nylon pour lesquelles le transfert peut se faire en milieu alcalin. Dans ce cas, l'ADN reste dénaturé pendant le transfert et la vitesse d'élution est augmentée (Durant 1988).

Ce mode de transfert n'est pas applicable aux membranes de nitrocellulose qui perdent leur capacité de fixation en milieu alcalin.

b) Le transfert bidirectionnel, qui permet d'obtenir 2 répliques identiques à partir d'un même gel

c) Les vacublots, qui utilisent le vide comme force d'aspiration du tampon. Le transfert est réalisé en 30 min.

d) L'électrotransfert, qui utilise un champ électrique pour faire migrer l'ADN du gel vers le filtre.

-Adaptation au transfert des ARN (Thomas, 1980)

Pour les ARN, un processus particulier a été mis au point, le Northern blot. Les ARN, contrairement aux ADN, sont en grande majorité simple brin et peuvent, après repliement tridimensionnel, créer des liaisons hydrogènes intramoléculaires qui empêchent l'hybridation.

J.C. Alwine a donc adapté la technique : le fractionnement des ARNs dans le gel se fait en conditions dénaturantes si bien que les ARNs maintenus sous forme simple brin migrent proportionnellement au logarithme de leur poids moléculaire.

On utilise pour le transfert un tampon de haute force ionique qui facilite la fixation des ARNs sur la membrane de nitrocellulose.

3. Hybridation *in situ*

1° Principe

L'hybridation est réalisée sur le site même de l'infection (frottis) ou sur le tissu cellulaire dégénéré (cas des cellules cancéreuses)

2° Réalisation

Les cellules à analyser sont fixées sur une lame microscopique et traitées pour dénaturer l'ADN ou l'ARN (Herzberg 1988).

L'hybridation se fait entre lame et lamelle avec utilisation d'un volume minimum de solution contenant la sonde complémentaire de la séquence à rechercher. La dénaturation est réalisée par chauffage de la lame à 100 °C suivie d'un refroidissement rapide. L'hybridation s'opère par renaturation lente à 39°C.

3° Intérêt

-Le temps nécessaire au test est fortement réduit étant donné que ce mode d'hybridation ne nécessite pas l'isolation et la purification de l'ADN à tester.

-La concentration de microorganismes à certains endroits permet d'augmenter la sensibilité de la détection.

-Le coût des équipements est minime.

-Cette technique est particulièrement utile dans les cas suivants :

-lorsque le virus à détecter n'est pas cultivable in vitro.

ex : virus de l'Hépatite B, le Papillomavirus (Bricout, 1988 et Garuti, 1989).

-Lorsque la rapidité du diagnostic est nécessaire pour détecter les germes cultivables

ex : Epstein-barr virus, Herpes virus (Bashir 1989)

-Pour des virus qui persistent longtemps à l'état latent

ex : virus de la varicelle (Bricout 1988).

4. L'hybridation en solution

1° Intérêt

Cette méthode permet de réaliser l'hybridation directement sur les échantillons biologiques (sang, urines, fèces,...) et ne nécessite donc pas l'isolation et la purification des acides nucléiques, le gain de temps est considérable.

Cependant, la séquence à rechercher est noyée dans la masse des séquences nucléiques, ce qui rend la détection difficile.

Il est donc nécessaire d'amplifier les systèmes de détection.

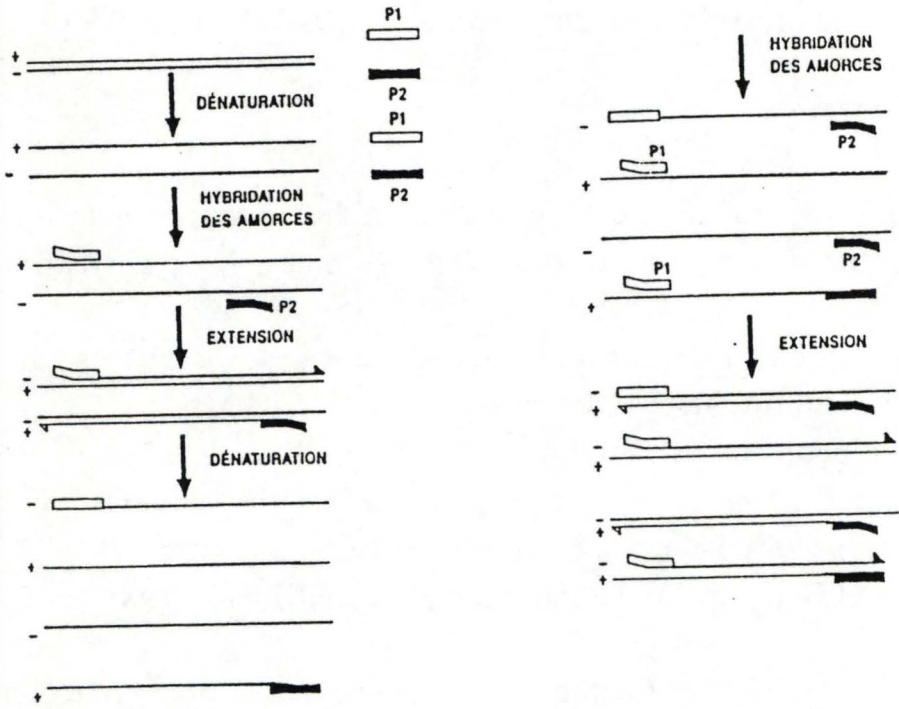


Fig. 7 : Principe du système d'amplification de la sonde hybridée par la "Polymérase Chain Reaction" (PCR).

2° Les modes d'amplification

-Le système de polymérase chain reaction (PCR) :
consiste à multiplier le nombre de molécules de sondes hybridées portant le signal, et ceci de manière spécifique.

Ce système utilise une ADN polymérase thermorésistante permettant de procéder à des cycles de synthèse interrompus de cycles de dénaturation à haute température pendant lesquels l'enzyme reste stable (fig. 7)

Dans un premier temps, deux sondes complémentaires de la séquence recherchée sont hybridées à l'échantillon. Ces sondes servent d'amorce à la polymérase et chacun des deux brins de l'ADN de l'échantillon sert de matrice pour l'enzyme.

Dans un deuxième temps, chacune des deux nouvelles doubles hélices ainsi formées va pouvoir être dénaturée à haute température et hybridée de nouveau aux mêmes "amorces" à partir desquelles l'enzyme effectuera une nouvelle extension des chaînes.

On peut produire 100 000 copies en 25 cycles.

-Le système de la Q Béta amplification, qui permet d'amplifier la sonde elle-même à l'aide d'une réplicase.

On introduit une sonde spécifique dans un ARN particulier :

le MDV-1 (substrat naturel de la Qbéta replicase qui a la propriété de se répliquer très rapidement).

Après hybridation de la sonde, on introduit dans le milieu de la Qbéta replicase dans le milieu. Cette dernière réplique l'ARN recombinat et donc la sonde (fig. 8)

-Le système des ARN ribosomiques.

Ces ARN sont des séquences déjà amplifiées chez les bactéries (chaque cellule possède environ 10 000 copies) et présentent de nombreuses séquences conservées entre espèces. Une fois la séquence recherchée identifiée, elle peut être reproduite chimiquement sous forme d'oligonucléotides.

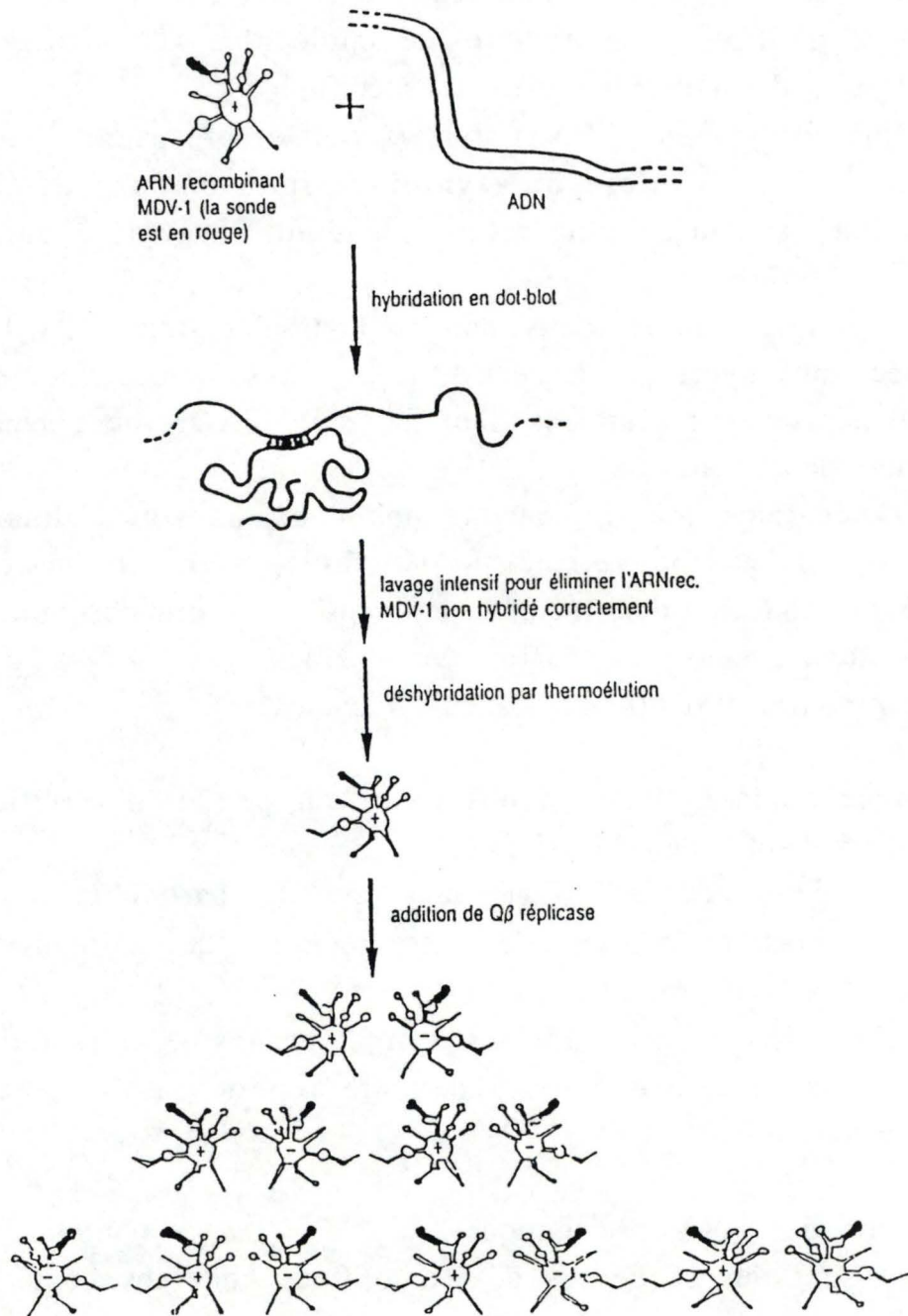


Fig. 8 : Principe de la Q Béta amplification.

C. Les stratégies d'hybridation

1. Hybridation sur support solide

1° sur supports

L'échantillon de DNA est immobilisé sur le support solide et l'hybridation a lieu dans un sac en plastique contenant le support et la sonde en solution.

2° en sandwich

La sonde est immobilisée sur un support solide et sert d'appât pour collecter une partie de la séquence cible qui est alors détectée par une seconde sonde marquée (fig. 9).

Bien que ces méthodes soient simples d'emploi, le temps nécessaire à leur réalisation est généralement long (incubation durant une nuit entière). On préfère généralement utiliser des méthodes d'hybridation en solution qui sont beaucoup plus rapides.

2. Hybridation en solution

1° Capture des hybrides sur phase solide

On pratique l'hybridation en solution suivie d'une capture des hybrides formés sur un support solides (fig. 10).

2° Les systèmes homogènes

-Stratégies basées sur le transfert d'énergie (Heller et Morrison 1985).

On utilise deux sondes marquées qui, lorsqu'elles se sont hybridées à la cible, mettent côte à côte leur marqueur respectif qui interagissent par exemple pour émettre un signal fluorescent (fig. 11).

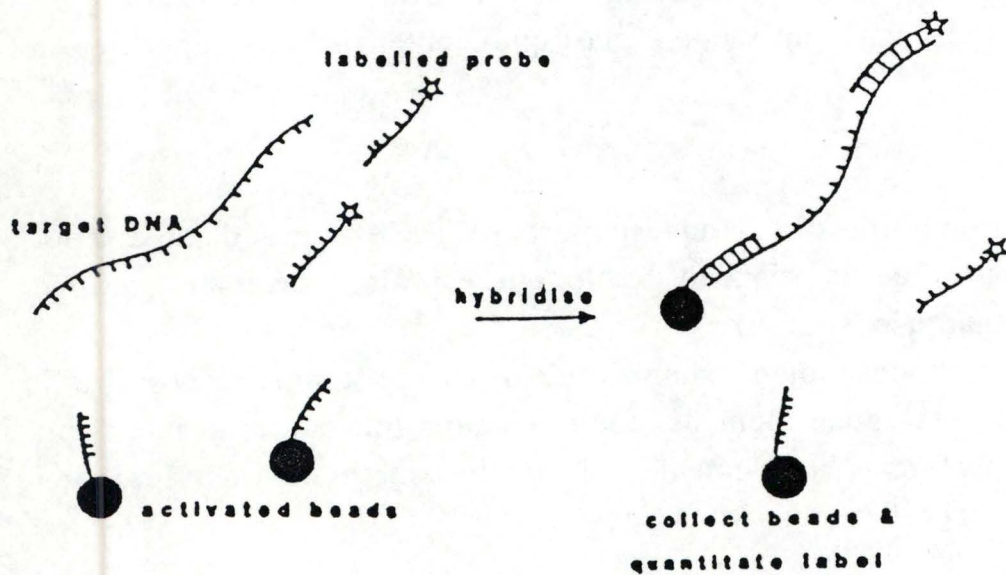


Fig. 9 : Principe de l'hybridation sandwich de sondes nucléiques.
 Cette méthode utilise une première sonde marquée
 et une seconde sonde immobilisée sur billes.
 Target DNA = DNA cible.

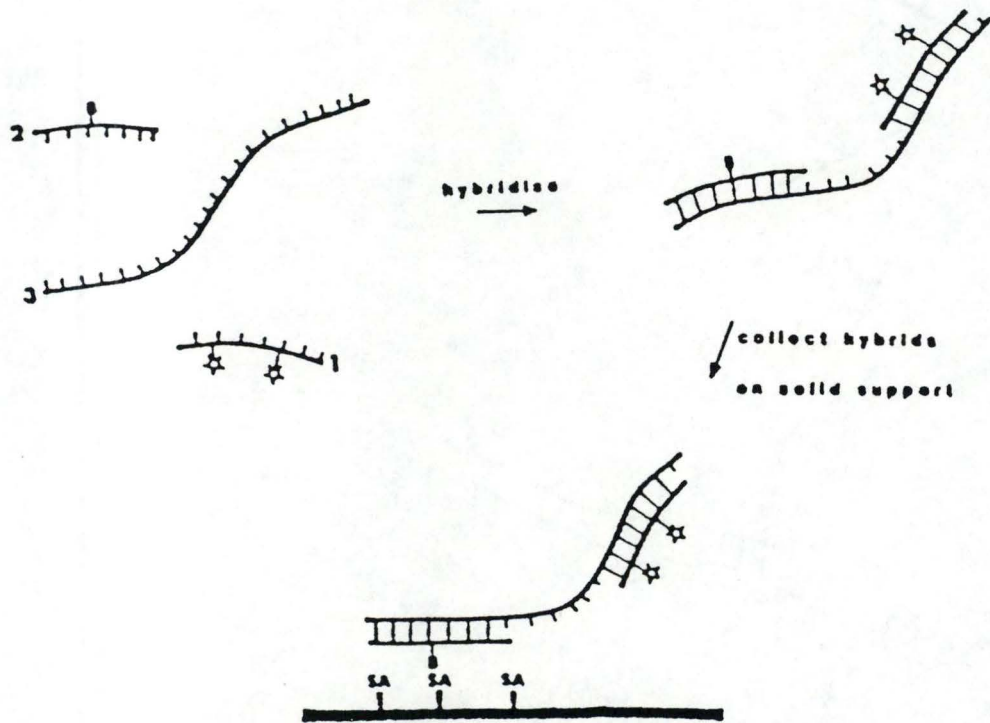


Fig. 10 : Principe de l'hybridation en solution suivie par une capture des hybrides sur un support solide. Cette technique utilise deux sondes marquées : une sonde marquée à la biotine qui va permettre la fixation de l'hybride sur le support solide et une sonde radioactive servant de marqueur quantitatif.

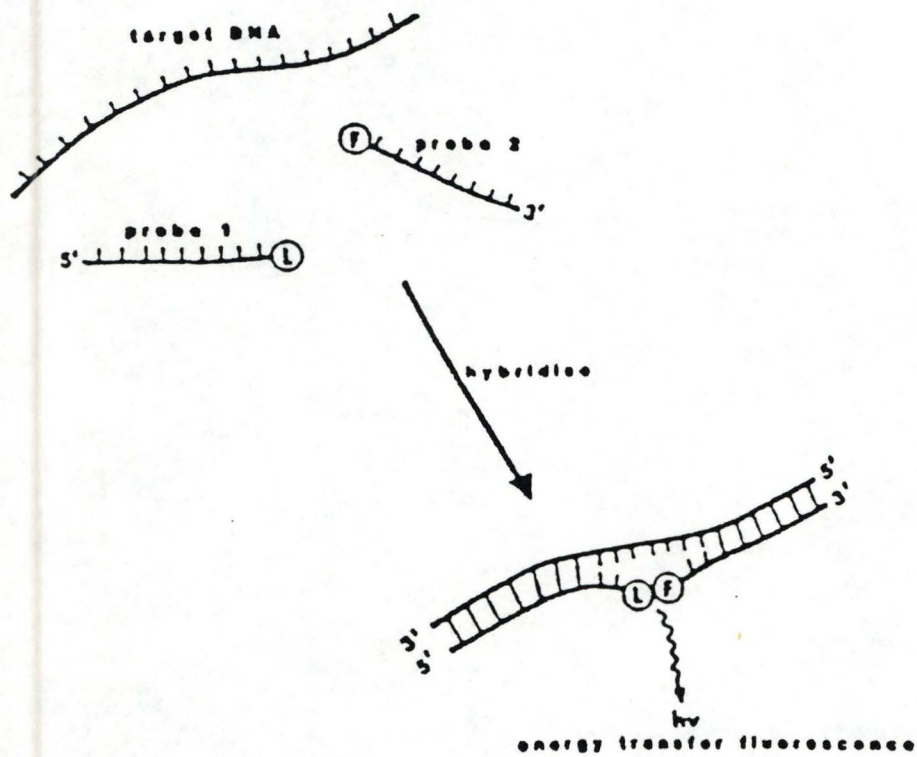


Fig. 11 : Principe de l'hybridation transfert d'énergie. Ce système utilise deux sondes marquées -une sonde marquée par un donneur chémoluminescent (ex : luminol).
 -une sonde marquée par un émetteur fluorescent (ex : la rhodamine).
 Target DNA = DNA cible, probe = sonde.

-Utilisation de l'éthidium bromide (Heller 1985).

On hybride une sonde marquée au luminol (substrat d'une réaction produisant de la lumière) sur la séquence cible et cela en présence d'Ethydium bromide (composé produisant de la fluorescence sous UV). Les spectres d'émission de ces deux types de lumière se superposent et conduisent à la production d'un signal amplifié et donc détectable.

-Transfert d'énergie absorbée par un Quencher (Matthews et Kricka 1988).

On utilise un anticorps marqué à la fluorescéine dirigé contre l'hybride DNA-DNA-Ethydium bromide (fig. 12). D'autre part, la sonde est biotinylée et l'avidine de reconnaissance est liée à un Quencher c'est-à-dire une substance qui absorbe une émission lumineuse (par exemple la fluorescence). L'Ac marqué à la fluorescéine est fluorescent en solution mais une fois lié au DNA hybride, la fluorescence est diminuée par le système Quencher-avidine-biotine-sonde. Cette diminution de fluorescence est mesurable.

-Le système Cédia (Henderson 1986)

Ce système utilise deux fragments de la β galactosidase qui individuellement sont inactifs mais qui, une fois associés forment une enzyme active produisant une plus grande amplification que les systèmes précédents.

-Principe des enzymes channel (Matthews 1988)

Il repose sur l'utilisation de deux Ac anti-DNA/RNA hybride. Le premier est marqué à la peroxydase et le second à la glucose oxydase (fig. 13). L' H_2O_2 produit par l'action de la glucose oxydase est utilisé en tant que substrat par la peroxydase quand les deux Ac sont liés ensemble sur l'hybride. Cela permet de détecter et de quantifier l'hybride sans nécessiter sa séparation, ce qui représente un gain de temps considérable.

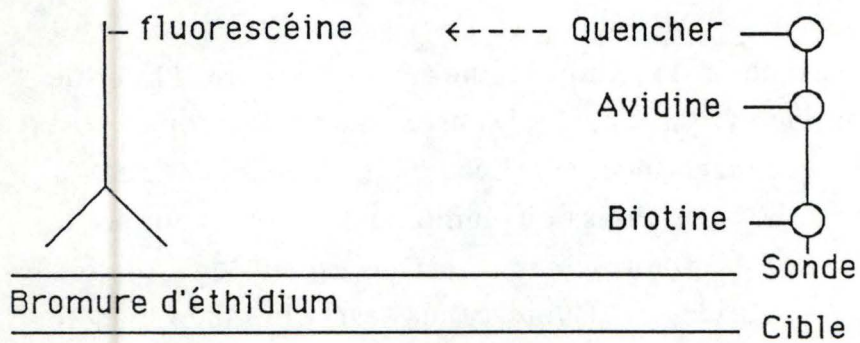


Fig. 12 : Principe de l'hybridation en solution dans un système homogène basé sur le transfert d'énergie. La fluorescence émise par un fluorochrome (fluorescéine) est absorbée par un Quencher.

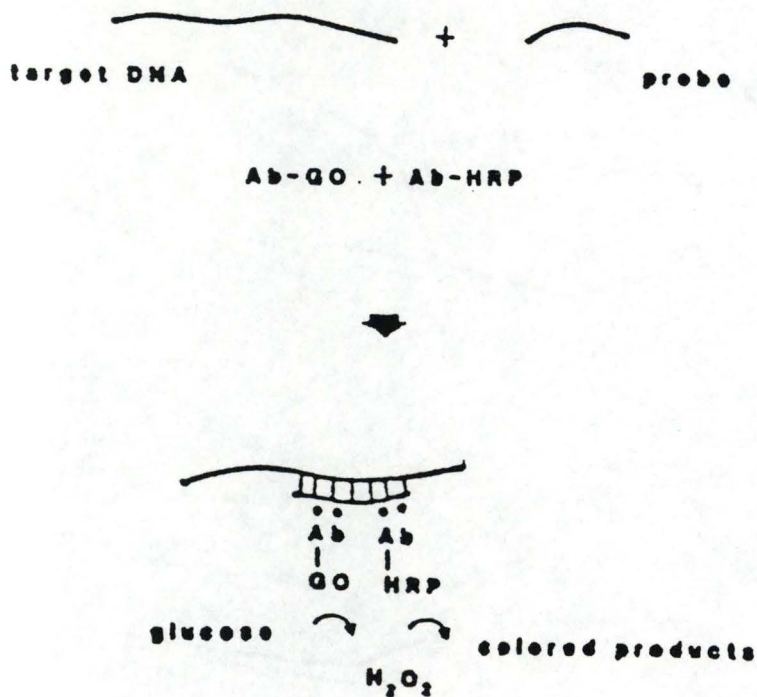


Fig. 13 : Principe de l'hybridation en solution dans un système homogène basé sur la technique des enzymes "channel".

HRP = peroxydase; GO = glucose oxydase;

Ab = anticorps anti-hybride DNA-RNA; probe = sonde;

target DNA = DNA hybride.

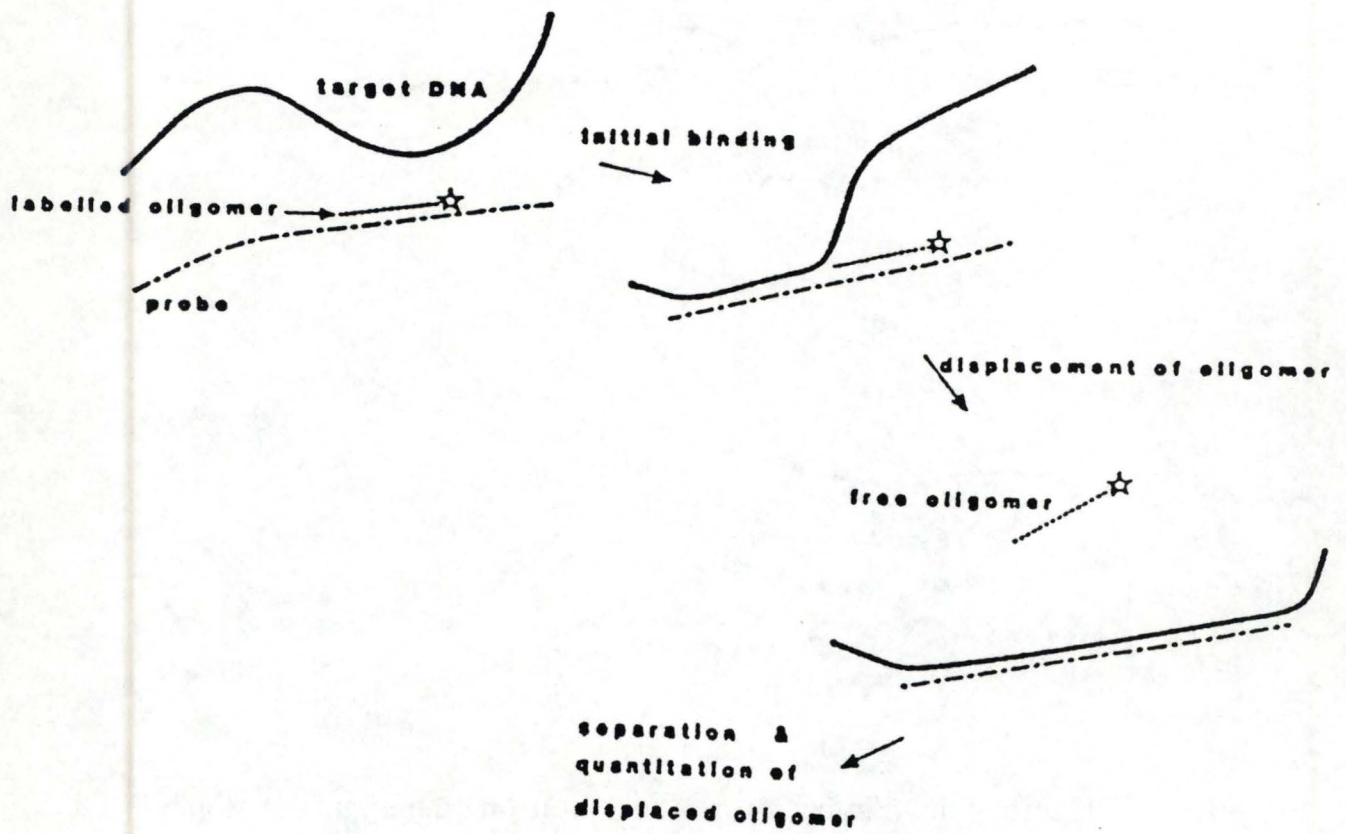


Fig. 14 : Principe de l'hybridation en solution utilisant le déplacement des brins. Cette méthode utilise deux types de sondes : l'une courte et marquée radioactivement, l'autre longue et non marquée.

3° Test utilisant le déplacement des brins (Matthews 1988)

On hybride d'abord une sonde marquée et très courte sur une sonde plus longue (fig. 14). Cette courte sonde peut être déplacée lors de l'hybridation avec une séquence cible complémentaire de la totalité de la sonde longue.

La courte sonde se retrouve alors en solution et peut être récupérée et détectée.

4° Utilisation d'agents "crosslink"

La plupart des stratégies d'hybridation reposent sur la rigidité des liens hydrogènes entre la sonde et cible. Yabusaki et ses collaborateurs (1985), ont suggéré d'employer un réactif crosslink bifonctionnel pour lier de façon covalente une sonde à sa cible.

3. Conclusion

Certaines procédures sont rapides et simples mais cela se fait souvent au détriment de la sensibilité. Par contre d'autres techniques sont plus complexes mais également plus sensibles.

D. Les différents systèmes de marquage des sondes

1. Les sondes radioactives (Durand 1988)

Les isotopes utilisés pour le marquage des sondes sont : ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I . Chacun présente des propriétés différentes et donc offre des avantages et des inconvénients.

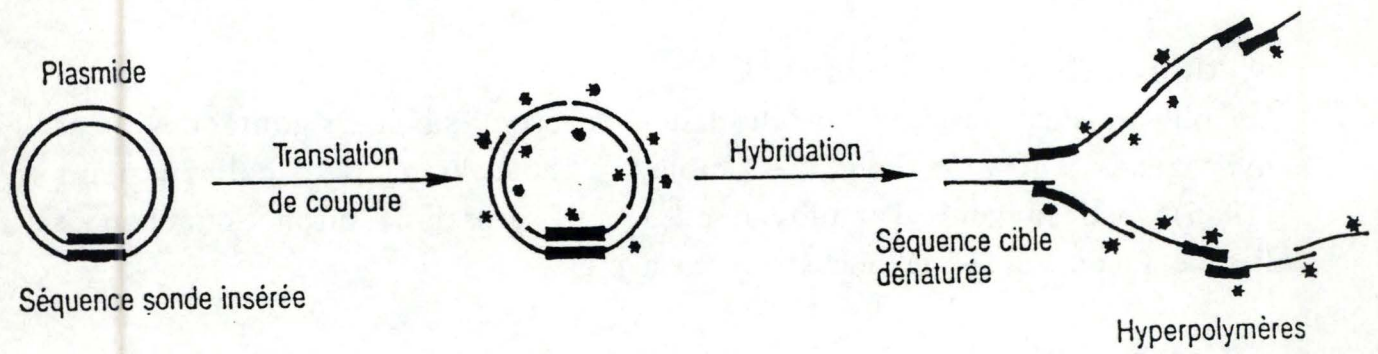


Fig. 15 : Technique de marquage radioactif d'une sonde double brin.

1° Les sondes plasmidiques double brin

La technique de marquage utilisée est la nick translation qui consiste à associer la DNAase I (qui fait des coupures simple brin dans le vecteur en laissant le fragment en 3' OH libre) avec une polymérase I douée d'une activité 3' polymérase (fig. 15).

En présence de nucléotides radioactifs, cette enzyme remplace une partie des nucléotides froids par ceux marqués. Lors de l'hybridation, les différents fragments radioactifs issus du vecteur recombinant forment des hyperpolymères entraînant ainsi une amplification du signal.

2° Les sondes simple brin

La seule différence avec les sondes doubles brins est que le vecteur utilisé est un phage simple brin comme le phage M13 (fig. 16).

3° Technique en sandwich

Une sonde non radioactive et insérée dans un vecteur est hybridée avec sa séquence cible (fig. 17). La révélation se fait via une autre sonde radioactive reconnaissant spécifiquement le vecteur.

4° Les sondes oligonucléotidiques

Ces sondes sont constituées de 14 à 21 nucléotides. Elles sont synthétisées à partir de la séquence connue d'un polypeptide et souvent dans le but de cloner les ARNm ou l'ADN génomique correspondant (fig. 18).

Leur avantage est leur simplicité de synthèse et leur spécificité.

5° Les sondes à ARN

Ces sondes sont en général plus difficiles à manipuler à cause de la RNase mais elles donnent un meilleur rapport signal/bruit.

Avantages : les hybrides ADN-ARN sont plus stables, le lavage peut donc se faire en condition plus stringentes et on peut utiliser la RNase A pour éliminer la sonde résiduelle.

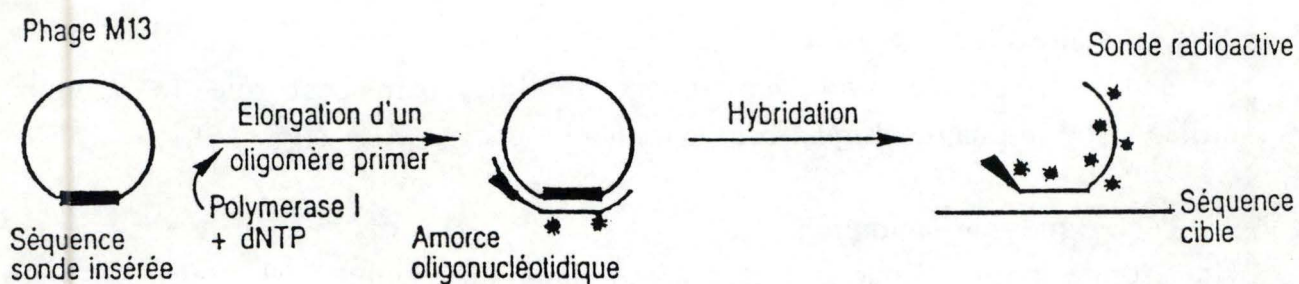


Fig. 16 : Technique de marquage radioactif d'une sonde simple brin à partir du phage M13.

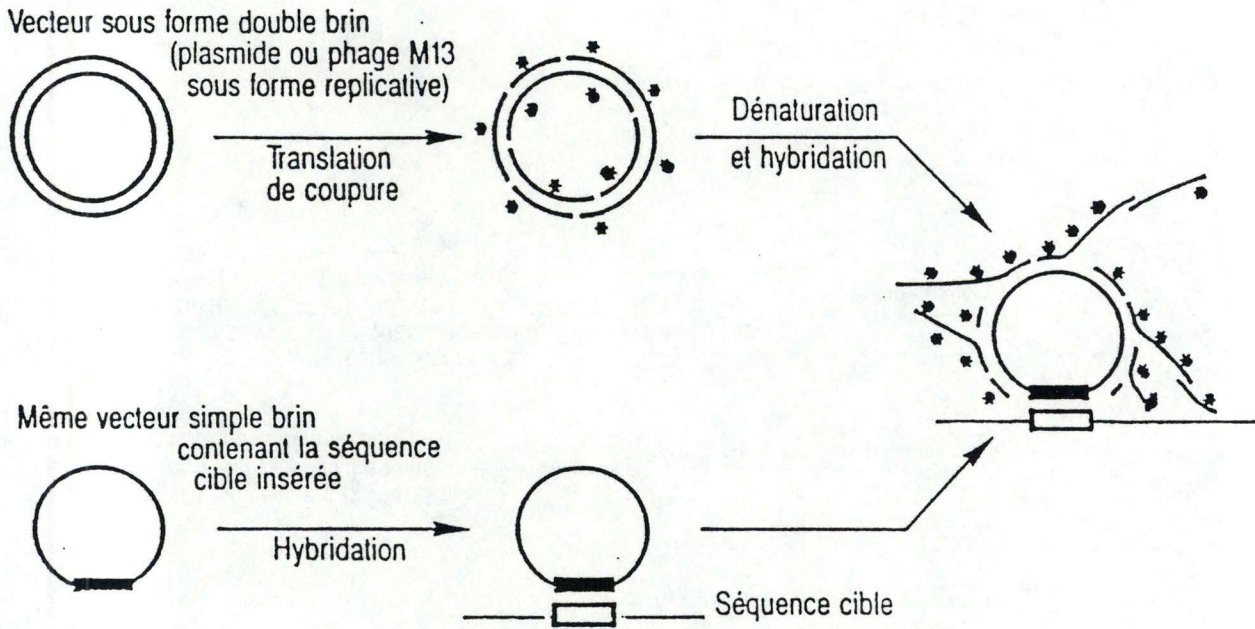


Fig. 17 : Marquage radioactif des sondes par une méthode dite "en sandwich".

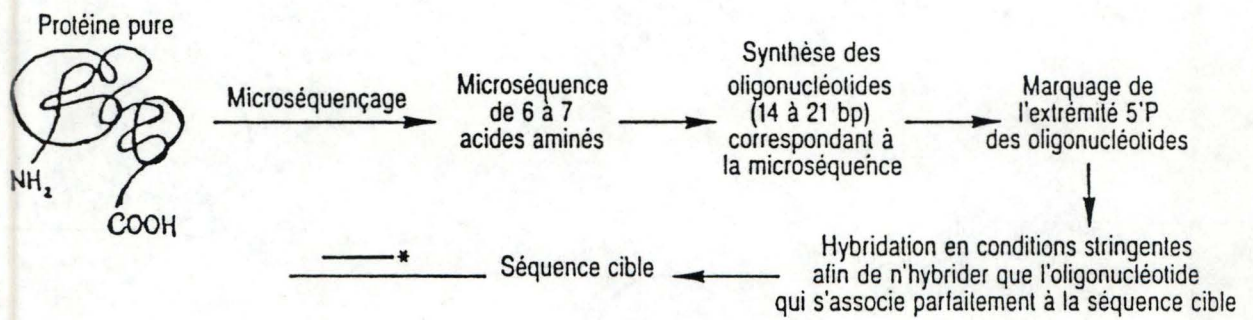


Fig. 18 : Synthèse de sondes oligonucléotidiques radioactives.

6° Conclusion

Actuellement, les sondes radioactives sont vouées à disparaître car bien que très sensibles, elles présentent de nombreux inconvénients :

-Le danger dû à l'exposition aux radiations

-l'utilisation d'un équipement spécial

-Les isotopes radioactifs ont un temps de 1/2 vie très court. Est liée à cela la difficulté pour les industries de fournir une qualité standard de sonde.

-La révélation de l'hybride prend du temps (24 h)

De plus, on assiste actuellement au développement spectaculaire des sondes froides qui présentent de nombreux avantages sur les sondes radioactives.

2. Les sondes froides

1° Intérêt pratique : -Elles ne nécessitent pas l'installation de pièces spéciales, équipées pour la manipulation et le stockage des produits radioactifs. Il n'y a donc pas besoin d'autorisation administrative.

-Elles sont plus simples à mettre en oeuvre et on peut même les utiliser sur le terrain.

-Elles sont sans danger pour l'utilisateur dans la mesure où elles ne font pas appel à des produits cancérigènes et où il n'y a pas d'exposition aux radiations.

-La durée de vie de ces sondes est extrêmement longue (1 an par exemple) et permet le stockage avant utilisation, sans crainte d'une perte d'activité.

-Gain de temps car les échantillons à tester peuvent être révélés en 1 h alors qu'il faut 24 h pour révéler les hybrides radioactifs.

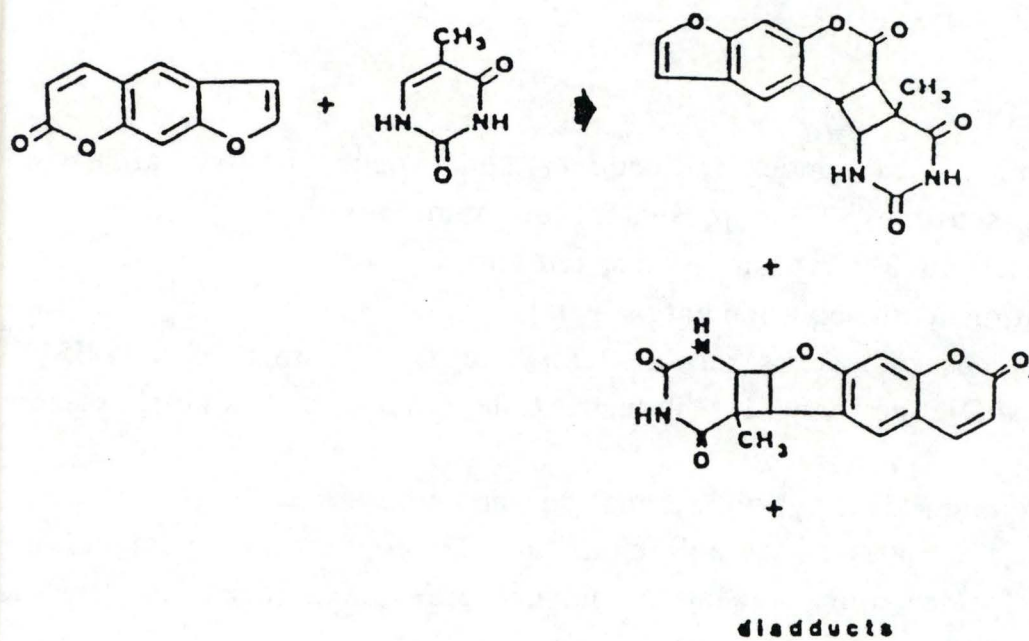


Fig. 19 : Réaction photochimique de cycloaddition de Psoralène sur les bases pyrimidiques (ici la thymine).

2° Intérêt diagnostic

Parmi les nombreuses applications des sondes froides en voici quelques unes :

- L'étude de l'hérédité cytoplasmique chez les plantes (ADN mitochondriaux et chloroplastiques). Cette étude donne des informations précieuses aux sélectionneurs sur le sens des croisements lors de la révélation ds'hybrides végétaux.
- La détection de routine de colonies bactériennes ou de phages recombinants
- La détection spécifique de bactéries et de virus.
- La détection de maladies génétiques :
 - dues à des gènes uniques mutés
ex : la mucoviscidose (maladie génétique récessive portée par un autosome)
 - dues à la mutation d'un seul nucléotide
- Etude de la résistance aux tumeurs

3 Les différentes techniques de marquage à froid

1° Les liens non covalents

Les marquages non covalents du DNA sont possibles via la formation de complexes s'intercalant dans l'ADN. Le marqueur le plus couramment utilisé est le bromure d'Ethidium (AL-Hakeem 1987).

2° Les liens covalents

Il existe des groupements chimiques pour lesquels on peut envisager des liaisons covalentes entre la sonde et les marqueurs.

a) Activation photochimique de marqueurs azides produisant un intermédiaire nitrène hautement réactionnel qui peut réagir rapidement et non spécifiquement avec de nombreux liens chimiques (Matthews 1988).

b) Réaction photochimique de cycloaddition de Psoralène sur les bases pyrimidiques (fig. 19). (Matthews 1988)

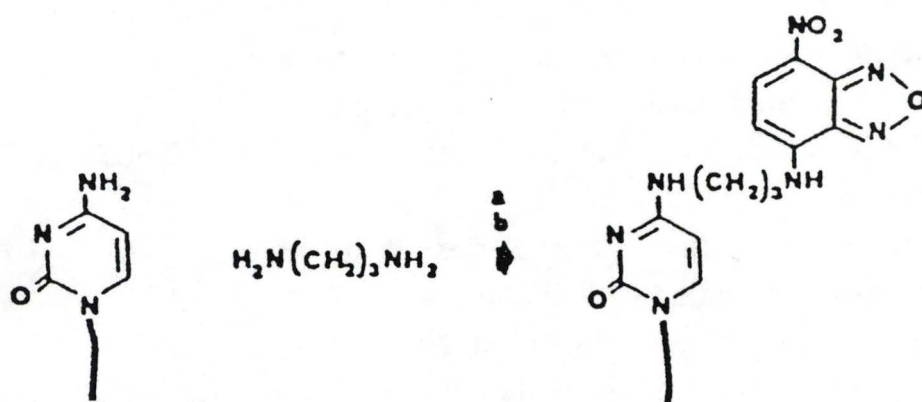


Fig. 20 : Transamination des cytosines avec des amines primaires.
 a = NaHSO_3 , OH ; b = 4-chloro-7-nitrobenzofurane.

c) Mercuration des bases nucléiques à l'acétate mercurique (Matthews 1988). Ces bases peuvent ensuite réagir avec des groupements thiols ou être converties en groupes Allyl disponibles pour la liaison avec un marqueur.

d) Transamination des cytosines avec des amines primaires (Matthews, 1988). Cette réaction est catalysée par du bisulfite (fig. 20) et fournit un moyen pratique d'introduire un groupement réactif sur une cytosine, formant ainsi un point d'attache pour un marqueur.

e) Substitution des amines (Matthews, 1988)

-Les groupes $-NH_2$ des bases nucléiques peuvent servir de site d'attachement aux marqueurs

-Le marquage via les groupes $-NH_2$ sur l'ADN peut aussi se faire avec des marqueurs contenant des groupements aldéhydes très réactionnels

-On peut aussi envisager une substitution d'amines pour attacher de la biotine (vitamine H) sur du DNA simple brin en utilisant de la biotine hydrazide.

f) Formation de ponts disulfures (Matthews, 1988). On peut introduire sur des pyrimidines des groupements thiols pouvant réagir avec un marqueur dérivé du SPDP (N-succinimidyl 3-2-pyridyldithio propionate) et former un pont disulfure.

g) Incorporation par nick translation d'un nucléotide marqué à la biotine (Matthews, 1988)
(fig. 21)

h) Alternative à la nick translation (Matthews, 1988). Le plasmide contenant la sonde est coupé à deux endroits, libérant ainsi la sonde. Puis on réalise la recircularisation du plasmide en présence de DNase I et de nucléotides marqués qui combleront le trou.

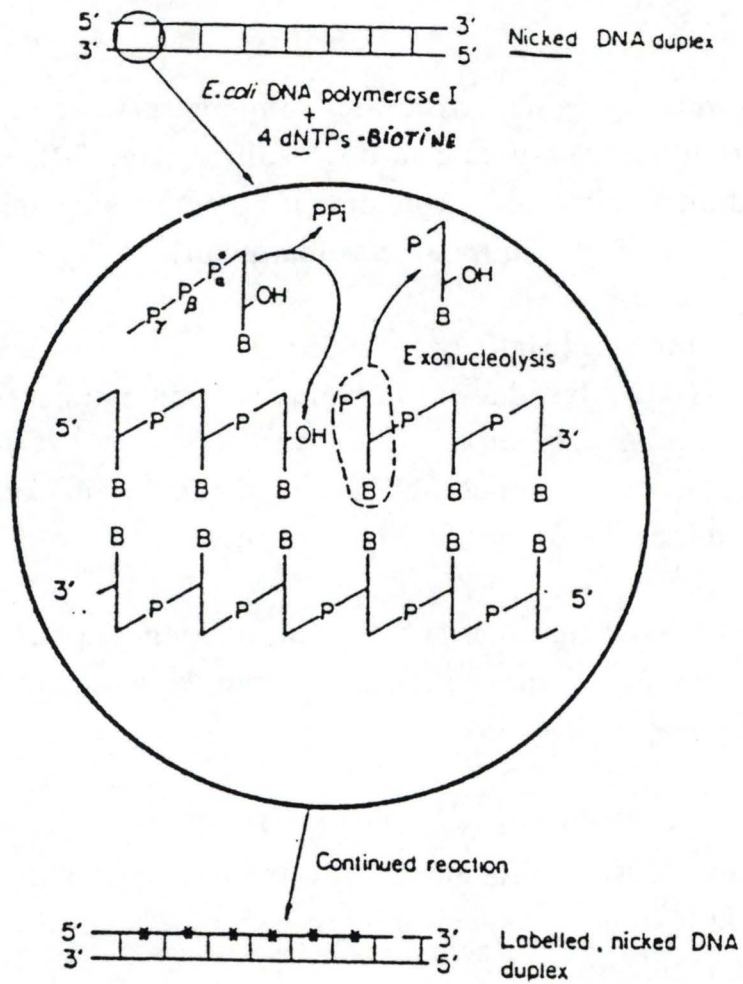


Fig. 21 : Incorporation d'un nucléotide marqué à la biotine par la technique de nick translation.

- i) Incorporation à la sonde de résidus glycosylés pouvant être reconnus par la concavaline A (lectine) (Matthews, 1988).
- j) Incorporation à la sonde d'un promoteur lactose (LAC) pouvant être détecté par un répresseur LAC et un second marqueur (Matthews, 1988)
- k) Marquage de la sonde à l'extrémité 3' (Matthews, 1988)
 -avec de la fluorescéine
 -avec du poly A. Le marqueur est détecté grâce une polynucléotide phosphorylase qui relache individuellement des molécules d'AMP converties en ATP par le système adénylate kinase-pyruvate kinase. L'ATP est ensuite détecté par une luciférase (enzyme produisant de la lumière)
- l) L'atome d'hydrogène en position C8 de la guanine est réactionnel et peut former des sites d'attachelements par exemple avec un dérivé N-acétylé (fig. 22) (Matthews, 1988).

E Les stratégies de détection de la sonde marquée

1. Introduction

Lorsque les sondes sont radioactives, il est possible de détecter l'hybridation par comptage ou par autoradiographie. La limite de détection de telles sondes tient essentiellement à leur radioactivité spécifique (exemple : la détection au ^{32}P est très sensible et est de l'ordre de 0,05 femtomole). Etant donné que ces sondes sont vouées à disparaître nous n'en parlerons pas d'avantage.

La détection des sondes froides fait appel à des systèmes enzymatiques simples comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase qui transforment un substrat incolore et soluble en un produit coloré qui souvent, précipite au lieu même de l'hybridation permettant ainsi sa visualisation rapide. A partir de ce principe, de nombreuses techniques ont été développées.

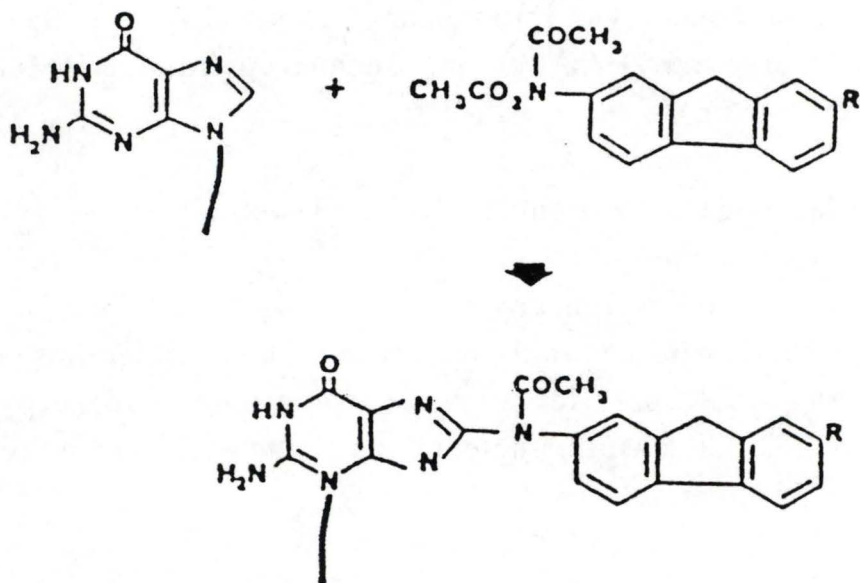


Fig. 22 : Marquage de la guanine (au niveau de l'atome d'hydrogène en position C8) avec un dérivé acétylé le N-acétoxy-N-acéthyl-amino-florène.

Elles sont fondées :

- 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 elles-même couplées à des enzymes marqueurs.
- soit sur la détection directe de l'hybride par couplage covalent d'une enzyme à la sonde.

2. La détection indirecte

C'est David Ward avec son équipe (1981) qui étudia le premier avec son équipe en 1981 un système de détection par sonde ADN non radioactive. Le principe consiste à réaliser un crosslink chimique entre de la biotine et une molécule d'ARN, ce complexe est ensuite utilisé comme sonde pour réaliser une hybridation in situ. L'hybridation est visualisée au microscope électronique après fixation d'un complexe avidin-ferritine sur la biotine. Le procédé connu sous le nom de système avidine biotine exploite l'importante affinité entre ces deux molécules.

1° Le système avidine-biotine

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

Cependant, l'avidine utilisée pour la détection d'hybrides fixés sur nitrocellulose se montre responsable de fixation non spécifique.

Pour diminuer ce type de fixation, l'avidine a été par la suite remplacée par la streptavidine présentant la même affinité que l'avidine pour la biotine mais sans la partie glycosylée impliquée dans l'élévation du bruit de fond (Lebacq 1987).

EXEMPLES

-Procédés GIBCO BRL et ENZO : révélation à la phosphatase alcaline
Ces sociétés ont couplé la phosphatase alcaline à la streptavidine (ou avidine). Après réaction avec la sonde biotinylée, la phosphatase alcaline dégrade alors un substrat chromogène qui peut être facilement quantifié.

-Procédé ORTHO : révélation à la peroxydase (HRP)

-Procédé CHIRON : il utilise le système avidin-biotine mais, en plus, se complique par une série d'hybridations sandwich permettant une amplification appelée multimérique (fig. 23).

L'ensemble des réactions se fait en solution et permet ainsi une cinétique plus rapide, en particulier dans les hybridations.

2° Le système du 5-bromodéoxyuridine de PASTEUR

Ce procédé utilise un analogue de base le 5-bromodéocyturidine (5-BdUr). Cet analogue est incorporé dans la sonde par nick translation.

L'hybride est visualisé après reconnaissance du 5-BdUr par un anticorps monoclonal de souris anti 5-BdUr. L'anticorps est ensuite lui-même reconnu par un anticorps de mouton anti-souris couplé à la peroxydase. La sensibilité est de l'ordre de 50 pg détectée sur dot-blot.

3° Le système des sonde sulfonées de ORGENICS ltd

La modification se fait directement par une réaction chimique (sulfonation) ou photochimique (photobiotine + rayon UV). Dans le cas d'une sulfonation, le groupement SO_3^- apparu est reconnu par un anticorps monoclonal de souris lui même reconnu par un anticorps de chèvre couplé à la phosphatase alcaline (fig. 24).

Ce procédé a été commercialisé sous le nom de CHEMIPROBE. Il permet d'obtenir un sensibilité de l'ordre du picogramme avec un bruit de fond peu élevé.

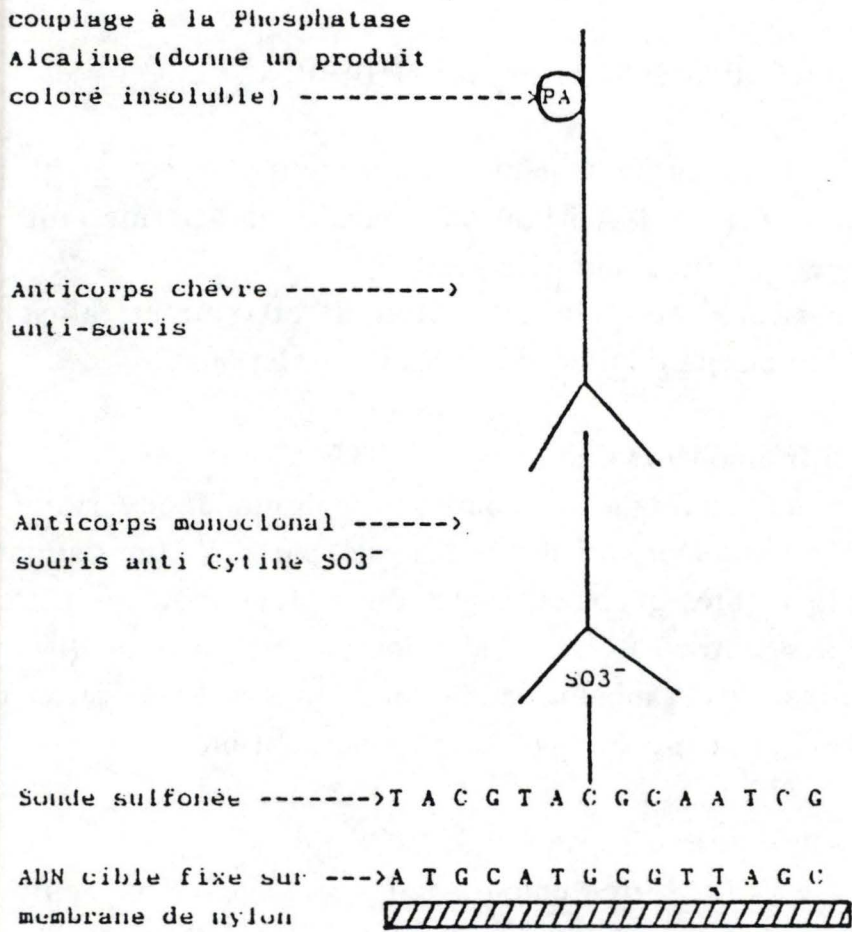


Fig. 24 : Principe de détection des sondes sulfonées.

4° Le système des sondes à la digoxine de BOEHRINGER-MANNHEIM
La digoxine se lie au carbone 5 de la thymine et le tout est incorporé à la sonde. La révélation de ce système se fait par des anticorps comme ci-dessus.

3. La détection directe

De nombreuses techniques sont en train d'être développées pour coupler directement et de manière covalente des enzymes comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase à des acides nucléiques. Le but est de réduire au maximum les étapes nécessaires à la détection des hybrides tout en conservant la même sensibilité.

EXEMPLES

-L'équipe de J.L. Ruth de MOLECULAR BIOSYSTEMS Inc et celle de GEN-PROBE commercialisent des sondes synthétiques pontées à la phosphatase alcaline (fig. 25).

-Les sondes pontées à la chémoluminescence de GEN-PROBE

La chémiluminescence est une production de lumière créée par l'excitation chimique d'un type particulier de molécules telles que le luminol, la lucigénine et leurs dérivés.

La chémiluminescence se distingue de la fluorescence et de la phosphorescence par le fait qu'ici, les molécules sont excitées chimiquement et non pas par une incidence de lumière à une longueur d'onde donnée entraînant une émission de lumière à une autre longueur d'onde.

GENE-PROBE a réussi à coupler directement l'acridinium ester (dérivé de la lucigénine) sur ses sondes (fig. 26).

Lorsque la sonde est hybridée, on ajoute une solution alcaline de H₂O₂.

La lumière est produite quand l'acridone excité redescend à son état de base non-excité en émettant une énergie électromagnétique (photon) dans la bande du visible.

Cette réaction est très rapide (quelques secondes) et permet une lecture quasi instantanée sur un luminomètre.

Phosphatase Alcaline

A C G T C G A G T A G C T A G

Fig. 25 : Sondes pontées de façon covalentes à la phosphatase alcaline (GEN PROBE).

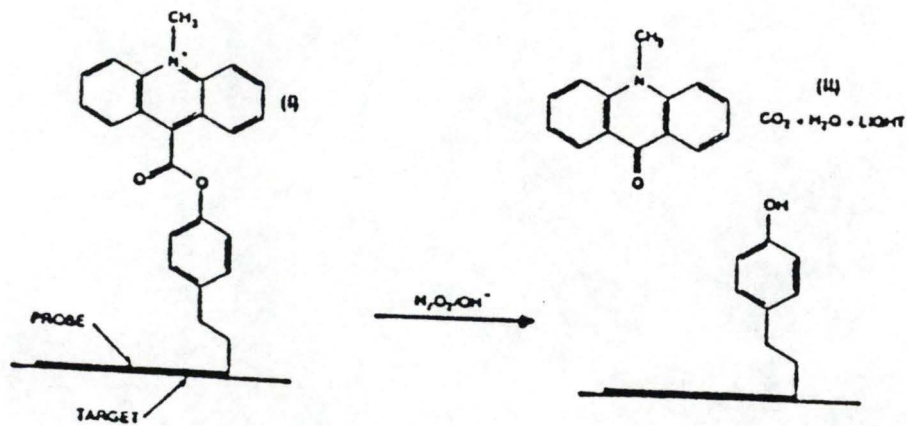


Fig. 26 : Principe du marquage des sondes à l'acridinium ester (dérivé de la luciférine).

Avantage des sondes directes :

- ce procédé permet de réduire les étapes de manipulations grâce au couplage direct de la sonde et du révélateur.
- ce procédé a en outre l'avantage de permettre une lecture facile, rapide et précise.

Inconvénient des sondes directes :

En général, l'enzyme directement couplé à la sonde constitue un encombrement stérique qui diminue les chances de rencontre entre la sonde et la séquence cible. L'enzyme marqueur doit pouvoir résister à l'élévation de température nécessaire lors de l'étape d'hybridation

Enfin, le couplage d'une petite molécule d'ester d'acridinium à la sonde (afin de limiter l'encombrement stérique) ne permet pas une très grande amplification du signal.

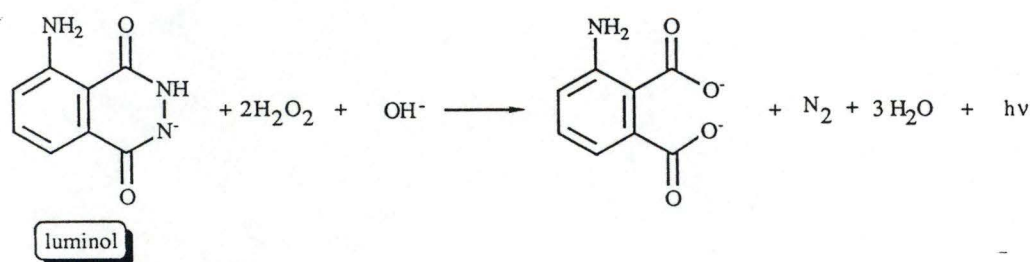
Nous avons repris ainsi les principales méthodes de détection qui sont actuellement proposées par les firmes commerciales. Nous avons brièvement indiqué les avantages et inconvénients de ces procédés.

Dans ce travail, nous avons voulu mettre au point un procédé de détection des sondes nucléiques en utilisant la détection froide. Nous avons donc dû résoudre une série de problèmes à chaque étape de la mise au point d'une détection d'une séquence d'ADN. Il s'agit d'une première étape qui devra servir à l'élaboration d'une méthode basée sur la bioluminescence et qui a été choisie pour sa sensibilité.

CHAP. II MATERIEL ET METHODES

A. Dosage de la Horseradish peroxydase (HRP) en chémoluminescence

1 Principe



2. Matériel

Un système de dosage de HRP (horseradish peroxidase) a été mis au point par Isabelle Alexandre (1988). Pour réaliser ce dosage, plusieurs réactifs sont nécessaires.

Les substrats sont H₂O₂ (Art. 7 209 perhydrol 30% H₂O₂), le luminol (5-amino-2,3 dihydro-1,4-phthalazinedione A-8 511). H₂O₂ est fournie par Merck (Darmstadt, West Germany) et le luminol est fourni par Sigma Chemical Company (St Louis, Missouri, USA).

L'enzyme HRP (horseradish peroxydase p-8 375 type VI) est fournie par Sigma.

Les dosages sont réalisés dans un tampon phosphate 0,2 mol/l à pH 7,4 réalisé avec KH₂PO₄ (Art. 4 873) de chez Merck.

Les appareils de mesure utilisés sont les luminomètres LUMAC Biocounter M2 010 (Schaesberg, Pays-Bas) et Turner 20. Les lectures se font dans des cuvettes spécialement conçues pour l'appareil. Nous avons également utilisé un appareil photo Polaroid (mis au point au laboratoire) contenant un film très sensible type 612 (20 000 ASA).

3. Méthode

1. Solution stock :

- tampon phosphate 0,2 mol/l pH 7,4
- HRP : 4 mg/ml de tampon
- luminol : 1mg/100ml de tampon phosphate
- H₂O₂ : 0,3%

2. Méthode :

Dans les tubes conçus pour le luminomètre LUMAC, la quantité maximale que l'on peut introduire est de 500 µl. Nous nous sommes donc arrangés pour que tous les réactifs se retrouvent dans un volume final de 500 µl c'est-à-dire comprenant :

- 340 µl de tampon phosphate
- 50 µl de luminol
- 100 µl d'H₂O₂

La réaction démarre à l'ajout de 10 µl de HRP.

Le signal lumineux est chaque fois enregistré pendant un temps fixé à une minute.

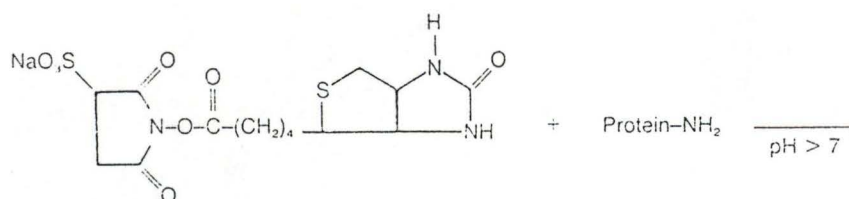
B. Couplage de la peroxydase à la biotine

1. Matériel

Le mode opératoire utilisé est une méthode de couplage de la biotine à des immunoglobulines. Ce mode opératoire a été mis au point au laboratoire.

Les réactifs utilisés sont :

- la NHS-biotine (H-1 759), fournie par Sigma.



-la HRP (Sigma P 8 375 type IV)

La mise en solution de la HRP est réalisée dans du tampon PBS.

La NHS-biotine étant insoluble dans le tampon, on la dissout au préalable dans du DMF (Janssen, Diméthylformamide 11.346.94)

2. Méthode

-dissoudre 100 mg de NHS-biotine dans 500 μ l de DMF rapidement et juste avant usage. Ajouter 500 μ l d'H₂O distillée

-diluer la HRP dans du PBS à raison de 5 mg/ml

-ajouter 10 mg (100 μ l) de NHS-biotine aux 5 mg de HRP (1 ml)

-incuber 2 heures à 22°C

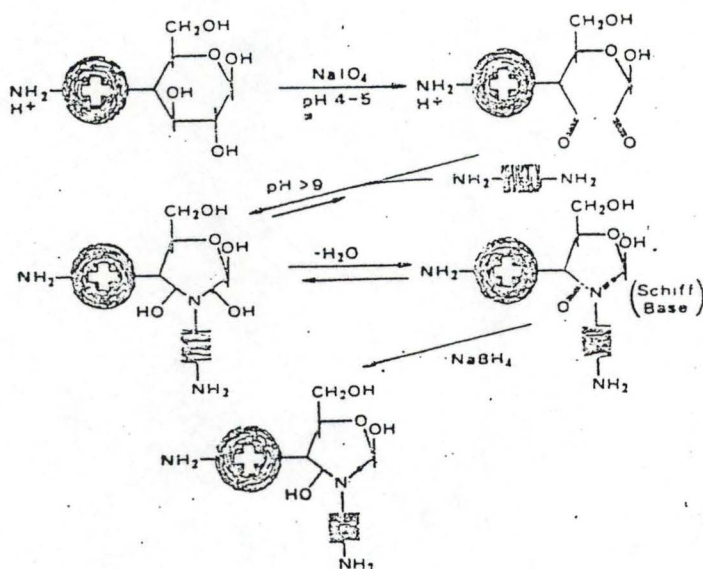
-dialyser contre du PBS pendant une nuit à 4°C

C. Couplage de la HRP à l'Avidine

1. Principe

Parmi les méthodes de couplage d'enzymes à des protéines, une des plus simples est celle qui utilise le périodate comme réactif conjugant (WILSON et NAKANE, 1978).

Le couplage s'opère en deux étapes. Au cours d'une première réaction, le métapériodate de Na va réduire les résidus glycosylés de la HRP et faire apparaître deux aldéhydes très réactives. Ces aldéhydes vont former une base de Schiff avec une fonction aminée de l'avidine. La liaison sera finalement stabilisée par oxydation au borohydrure de sodium (NaBH₄).



2 Matériel

L'enzyme utilisée est la HRP (Sigma, P-8 375 type VI). Le réactif de couplage utilisé est le NaIO_4 (métapériodate de sodium, Merck Art. 6 597). Les tampons utilisés sont : l'acétate de sodium, (Merck Art. 6 267) et le carbonate de sodium. (Merck, A. 6 329).

Nous avons aussi utilisé de l'avidine (Sigma, A. 9 275).

Les conjugués obtenus sont stabilisés dans une solution de NaBH_4 (borohydrure de sodium 198 124 107) de chez Fluka AG, Buchs SG.

Afin de séparer les conjugués des réactifs n'ayant pas réagis, on réalise une chromatographie sur HPLC (tamis moléculaire, Superose 12). L'HPLC est constitué d'une pompe HPLC. 420 de marque KONTRON (Suisse). L'intégrateur-enregistreur est un ANACOMP. 820 de marque KONTRON. Le détecteur UV est un détecteur UVIKON 735 LC (KONTRON).

La concentration des échantillons se fait dans des centrions

La centrifugeuse utilisée est de marque Beckman, type 213 (U.S.A.).

Les conjugués sont stabilisés dans de la SAB (Sigma, sérum albumine bovine A.6 793).

3. Méthode

- dissoudre 4 mg de HRP dans 1 ml d'H₂O bidistillée
- préparer 0,2 ml de NaIO₄ 0,1 mol/l et l'ajouter à la HRP.
Le métapériodate est mis en solution dans du tampon acétate de Na 1 mmol/l pH 4,4. Laisser agir 20 min à T° ambiante
- dialyser la HRP-aldéhyde contre du tampon acetate de sodium 1 mmol/l pH 4,4 pendant une nuit à 4°C
- augmenter le pH de la solution HRP-aldéhyde jusqu'à 9-9,5 par addition de 20 µl de tampon carbonate de sodium 0,2 mol/l pH 9,5 et y ajouter immédiatement 5,9 mg d'Avidine en solution dans 1ml de carbonate de sodium 0,2 mol/l pH 9,5.
Laisser réagir 2 heures à T° ambiante
- ajouter 0,1 ml d'une solution de borohydrure de sodium 4 mg/ml de H₂O₂. Laisser réagir 2 heures à 4° C
- réaliser une chromatographie sur HPLC avec concentration des échantillons, avant injection, dans des centricons.(on centrifuge à 6 000 rpm pendant environ 30 min). La colonne est équilibrée avec du PBS. Le flux est fixé à 0,3 ml/min.
On réalise deux injections, l'une avec la longueur d'onde de détection fixée à 405 nm (longueur d'onde à laquelle le groupement hème de la peroxydase absorbe) et l'autre à 280 nm.(longueur d'onde d'absorbance de toutes les protéines)
- les absorbances de chaque fraction (2 ml) sont mesurées et celles comprenant les conjugués sont additionnées de SAB (10 mg/ml) et congelées à -20°C.

D. Couplage de la biotine à des IgG

1. Matériel

Le mode opératoire utilisé est celui décrit par Strasburge et Kohen (1989).

Pour réaliser ce couplage, nous avons utilisé des IgG de mouton anti-IgG de lapin lyophilisés mis en solution dans du tampon PBS.

Nous avons utilisé les tampons phosphate (Na_2HPO_4 , Merck Art.6580) et Tris-HCl (hydroxy-méthyl-amino-méthane Janssen Chimica 16.762.78).

La biotine utilisée est de la NHS-biotine qui va réagir avec les fonctions aminées des anticorps.

(Sigma, Hydroxysuccinimide biotin H-1 757). La séparation des conjugués des réactifs s'opère par passage de la préparation sur une colonne (1,2 x 10 cm) G25 Séphadex (Pharmacia-LKB, Upsala, Suède). La colonne est équilibrée avec du tampon TRIS-HCl, 25 mmol/l pH 7,1 (Tris hydroxy-méthyl-amino-méthane, Janssen 16.762.78).

Les conjugués sont stabilisés dans de la SAB (Sigma, sérum albumine bovine A-6 793).

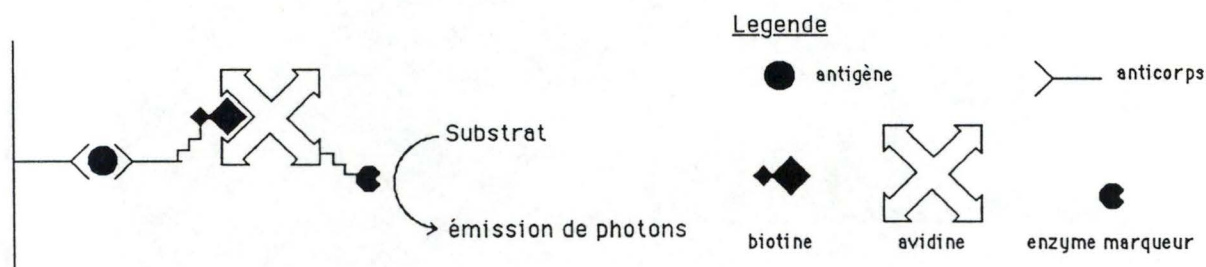
2. Méthode

- concentrer la fraction d'IgG à 1 mg/ml de PBS 10 mmol/ml, pH 7,2 sur une membrane P10 Amicon et garder à -20°C .
- rendre la solution basique pour la biotinylation par addition de 50 μl de tampon phosphate (1 mol/l pH 9) par ml de solution d'IgG
- ajouter à chaque mg d'IgG 250 μg de NHS-biotine dans 10 μl de DMF. Laisser réagir 4 heures à T° ambiante (cette réaction s'opère avec un excès de 75 moles de NHS-biotine pour une mole d'IgG)
- éliminer la NHS-biotine en excès du conjugué IgG biotinylés par passage des produits sur la colonne G 25 Séphadex (1,2 x 10 cm) équilibrée avec du tampon TRIS-Hcl 25 mmol/l pH 7,1 (le détecteur est réglé à 280 nm afin de suivre l'élution des protéines).
- recueillir le premier pic et stabiliser les conjugués IgG-Biotine par addition de 5 μl de SAB 20% par ml de conjugué (voir chromatogramme fig.29)

E. ELISA

1 Principe

Le test a été réalisé dans des plaques multipuits (Titertek immuno assay-plate, 77-175-05, Flow laboratories, Pays-Bas) et suit le schéma suivant (fig.B):



- recouvrir les boîtes avec des IgG de mouton anti-IgG de lapin
- ajouter l'antigène (IgG de lapin) à différentes concentrations
- ajouter des anti-IgG biotinylées
- ajouter de l'avidine marquée à la HRP
- révéler la HRP

2 Matériel et méthode

1) Détermination des concentrations en conjugués à utiliser pour le dosage ELISA

Ne connaissant pas les concentrations optimales en conjugués à utiliser pour réaliser ce test, nous avons tout d'abord déterminé les courbes de titration en IgG-biotine et en Avidine-HRP, en utilisant une quantité d'Ag constants fixés sur la boîte 96 puits.

Méthode :

- 1° Immobiliser les Ag sur la boîte à raison de 200 µl/puits
 - IgG de lapin (purifiées par chromatographie d'affinité, lyophilisées et conservées à -20°C) pour le test

-IgG de souris (purifiées et conservées dans du PBS à raison de 5,6 mg/ml) pour le blanc.

La dilution des IgG est de 10 µl/ml de tampon borate 100 mmol/l pH 7,4 et 9,5 g/l de NaCl.

Le tampon borate est composé de H₃BO₃ (Sigma A 4 873) et de NaCl 0,5 g/l.

le temps d'incubation est de 24 h à T° ambiante

2° Saturation à la SAB : 200 µl/puits

la SAB 5 g/l (Sigma A-6 793) est mise en solution dans du tampon borate

le temps d'incubation est de 4 h à T° ambiante

3° Rinçage : 200 µl/puits

- 2 rinçages avec une solution de Tween 20 0,5 % (Sigma, Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate P-1 379)

- 1 rinçage avec une solution composée de Tween 20 0,5 % et saccharose 5 g/l

4° Sèchage de la boîte à l'étuve (45°C) pendant 15 min

(à ce stade on peut conserver la plaque à 4°C sous vide dans un sac silica gel pendant plusieurs jours)

5° Incubation de l'Ac (IgG de mouton anti-IgG de lapin couplés à la biotine) : 100 µl/puits

l'Ac est utilisé non dilué, dilué 10 X et dilué 100 X à partir d'une solution stock de 0,5 mg/ml.

La dilution est réalisée dans un tampon "ELISA" composé de Tris-HCl 0,05 mol/l à pH 7,7 (Janssen 20 779 21), de NaCl 15 mmol/l, de SAB 0,5 % et de Tween 20 0,05 %.

Le temps d'incubation est de 5 à 24 h à 4°C

6° Rinçage : 200 µl/puits

On réalise 2 rinçages avec une solution de lavage "ELISA" composée de Tween 20 0,5 % et de NaCl 0,15 mol/l

7° Incubation avec le conjugué avidine-HRP : 100 µl/puits

le conjugué est utilisé non dilué, dilué 10 X, 20 X, 40 X, 80 X, 160 X, 320 X et 640 X à partir d'une solution stock de 0,6 mg/ml

la dilution est réalisée dans le tampon ELISA

8° Rinçage : 200 µl/puits

on réalise 3 rinçages avec la solution de lavage ELISA

9° Révélation :

a) en spectrophotométrie

-la révélation se fait par addition de 50 µl/puits d'une solution composée de :

-2 mg d'ABTS

(2,2-Azinobis 3-éthylbenzthiazoline 6-sulfonic acid, Sigma A 4 798)

-3 ml de tampon citrate pH 5,6 composé de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Art. 6 580) et d'acide citrique (Merck, Art. 244).

-2,5 µl d' H_2O_2 30% (à ajouter juste avant emploi)

-Incuber 15 min à 37°C

-stopper à 0°C

-lire les absorbances à 405 nm au lecteur de plaque Dynatech type MR 600 (U.S.A.).

b) en chémoluminescence :

La lecture est effectuée dans des microplaques pour immunoassay. L'appareil de détection est un simple appareil photo contenant un film Polaroid très sensible (20 000 ASA).

les puits ne pouvant contenir que 200 µl de solution, il faut ajuster les différentes quantités de substrats pour respecter les concentrations que l'on a trouvées par optimisation du système de détection de la HRP en chémoluminescence.

La révélation de la HRP se fait par addition de 100 μ l/puits d'une solution composée de :

- 10 μ l de luminol (Sigma, 5-amino-2,3 dihydro-1,4 phthalazinedione A-8 511), 1 mg/25 ml tampon phosphate
- 20 μ l d' H_2O_2 0,03% (Merck, Art. 7 209)
- 70 μ l de tampon phosphate 0,2 mol/l pH 7,4

2) ELISA proprement dit

Une fois les titres en IgG biotinylés et avidine-HRP déterminés, pour le dosage ELISA, nous avons réalisé une courbe de concentration en Ag (IgG de lapin).

Méthode : (voir figure B)

- 1° Immobiliser les Ac trappeurs sur la boîte : 200 μ l/puits
 - IgG de mouton anti-lapin pour le test à raison de 10 μ g/ml de tampon borate 10 mmol/l pH 7,4 et 9,5 g/l de NaCl
 - IgG de souris pour le blanc, 10 μ g/ml
 - Incuber 24 h à T° ambiante
- 2° Saturation à la SAB 0,5% : 200 μ l/puits
 - incuber 4 h à T° ambiante
- 3° Rinçage : 200 μ l/puits
 - 2 rinçages avec Tween 20 + H_2O
 - 1 rinçage avec Tween + H_2O + saccharose
- 4° Sèchage : 15 min à 45°C
- 5° Incubation de l'Ag (IgG de lapin), 100 μ l/puits
 - on réalise 16 dilutions à partir d'une solution stock de 1,3 mg/ml :
 - 10 X, 20 X, 40 X, 80 X, 160 X, 320 X, 640 X,
 - 1 280 X, 2 560 X, 5 120 X, 10 240 X, 20 480 X,

40 960 X, 81 920 X, 163 840 X, 327 680 X.

La dilution de l'Ag est réalisée dans du tampon phosphate 0,05 mol/l pH 7,4 (KH₂PO₄, Merck Art. 4 873) 5 g/l de SAB
- incuber 2 h à 20°C

6° Rinçage : 200 µl/puits

on réalise 3 lavages avec du tampon Tris-HCl 0,1 mol/l pH 7,5

7° Incubation avec les IgG de mouton anti-lapin biotinylés à la concentration optimale :

- 100 µl/puits.

- incuber 5 à 24 h à 4°C

- on réalise 2 rinçages avec la solution de lavage ELISA

8° Incubation avec l'avidine-HRP à la concentration optimale déterminée précédemment :

- 100 µl/puits

- incuber 1 h à T° ambiante

- on réalise 3 rinçages avec la solution de lavage ELISA

9° La révélation se fait de la même façon que précédemment

F Hybridation de la sonde biotinylée

1 Principe

Le principe consiste à hybrider une sonde biotinylée sur une séquence spécifique d'un ARNm qui lui est complémentaire. Généralement on utilise des sondes radioactives. Ici, la détection des sondes fait appel à des systèmes enzymatiques comme la HRP qui peut d'une part transformer un substrat incolore (di-amino-benzidine) et soluble qui diffuse dans le gel en un produit coloré et qui précipite à l'endroit de l'hybridation (car ne peut plus diffuser

dans le gel) et d'autre part qui catalyse l'oxydation du luminol par H_2O_2 dans une réaction produisant de la lumière.

2 Matériel et méthode

1/ Isolation des RNA

(peut se faire à partir d'un petit nombre de cellules eucaryotes, de 10^5 à 5.10^7 ; le rendement est normalement de 2-30 μg de RNA par 10^6 cellules)

L'isolation d'ARN est réalisée à partir de cellules confluentes (fibroblastes humains WI 38).

Précautions :

Vaisselle plastique à autoclaver, vaisselle en verre à stériliser à $180^\circ C$ pendant au moins 4H.

Travailler avec des gants à cause des RNAses présentes sur la peau.

Manipulations à faire à froid :

- éliminer le milieu de culture
- laver 3-4 fois avec PBS froid
- râcler les cellules dans 1 ml de PBS par boîte
- centrifuger à 400 RPM pendant 5 min à $4^\circ C$.

La centrifugeuse utilisée est de marque Hettich Univeral type 1 200 (Tuttlingen).

- ajouter au précipité 1 ml de tris salin froid constitué de :

*25 mmol/l Tris pH 7,4 (Janssen, 156.762.78)

*130 mmol/l NaCl

*5 mmol/l KCl (Merck, 4936 1000)

* H_2O RNase Free (RF) composée pour 1 l de 990 ml d' H_2O distillée, 1 ml de DEPC (Sigma, diéthylpyrocarbonate P 5 758) et 9 ml d'éthanol absolu.

Resuspendre

- passer à l'homogénéisateur Dounce (15-20 fois)
- centrifuger à 3 000 RPM pendant 30 sec à $4^\circ C$

- ajouter au précipité 400 μ l de tris-salin
 - 100 μ l de NDD : * 100 ml de Tris-salin
 - *1 g NP40 (Nonidet P40, Sigma N 6 507)
 - *0,5 g Na déoxycholate (Merck, 6 504)
 - *0,01 g dextran-sulfate (Sigma, D-8 906)
 - inverser 10 fois dans le tube Eppendorf
 - centrifuger à 3 000 RPM pendant 30 sec à 4°C
 - précautionneusement transférer le surnageant dans le tube Eppendorf
 - contenant 500 μ l de phénol/chloroforme (1/1)
 - + 25 μ l de SDS 20 %
 - + 15 μ l de NaCl 5 mol/l
 - mélanger brièvement
 - centrifuger à 15 000 RPM pendant 2 min à 20°C
- La centrifugeuse utilisée est de marque Janetzki, type TH 12 (Bruxelles).
- ajouter au surnageant 500 μ l de phénol/chloroforme
 - mélanger
 - centrifuger à 15 000 RPM pendant 2 min à 20°C
- (il y a précipitation des protéines à l'interface phénol-surnageant)
- répéter l'extraction jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéines à l'interface
 - le phénol est éliminé du surnageant par addition de 500 μ l de CHCl_3 /Isoamylalcool (24/1)
 - centrifuger à 15 000 RPM pendant 2 min à 20°C
 - ajouter au surnageant 1 ml d'éthanol absolu
 - laisser précipiter l'ARN à -20°C pendant au moins 30 min
 - centrifuger à 15 000 RPM pendant 10 min à 20°C
 - laver dans EtOH 80 %
 - centrifuger à 10-15 000 RPM pendant 10 min à 20°C
 - sécher au speed-vac (centrifugeuse reliée à une pompe à vide) pendant 5-10 min. La centrifugeuse est de marque Savant, type SVC 100 H et la pompe est de marque Cenco Hyvc 7, type 91 501.

- resuspendre dans 20 μ l de H₂O RF
- éventuellement ajouter du RNase inhibitor

2/ Electrophorèse en gel dénaturant

Solutions (toujours RNase Free) :

- Mops 10x : - Mops 0,2 mol/l (Sigma cell culture reagents M 6 270)
 - NaOAc 0,05 mol/l (Merck, A 6 267)
 - EDTA 0,01 mol/l (Merck P.8 418) pH 7,0
 - DEPC

pour 500 ml : Mops 20,9 gr

NaOAc 3 mol/l 8,3 ml

EDTA 0,5 mol/l 10 ml

500 μ l DEPC pur (diéthylpyrocarbonate)

- loading buffer : 0,72 ml formamide désionisée (Sigma, F. 7 503)
 - 0,16 ml Mops 10 x (pH 6-7)
 - 0,26 ml formaldéhyde (37 % méthanol, Belgolata B 1 900)
 - 0,18 ml H₂O
 - 0,1 ml glycérol (Merck A. 4 094)
 - 0,08 ml bleu de bromophénol (Merck, 8 122) saturé (saturation dans l'alcool, puis dilution 10 x dans H₂O RF)

- H₂O RF : eau bidistillée

traitée au DEPC : stock à 10 % dans EtOH

à diluer 100 x dans la solution aqueuse
laisser agir une nuit à 37°C
autoclaver

- SSC 10 x : * 87,65 g NaCl
 - *44,10 g Na citrate (tri-natriumcitrat-2-hydrat, A 6 448)
 - *ajouter H₂O RF jusqu'à 1 L
 - *ajuster à pH 7,0

- Formaldéhyde 37 % méthanol

Gel

- Agarose : 1,3 % (Sigma, A. 6 877 type II)
+ 10,5 ml Mops 10x
+ 89,5ml H₂O RF

Faire fondre l'agarose à 50°C

- Ajouter 5,6 ml de formaldéhyde (sous hotte), 0,66 M
Couler le gel sur le support au préalable lavé avec du SDS 1 %
- Echantillons : * RNA resuspendus avec 2 µl de loading buffer
*les dénaturer 2 min à 95°C
*les déposer sur le gel

- Tampon d'électrophorèse : Mops 1x + Bromure d'éthidium à 0,5 µl/ml (BrEt, 2,7-diamino-10-éthyl-9-phénylthérantridinium bromide, Sigma E 8 751)

- Migration : 1-2 h à 100 V

- Prendre une photo

L'appareil photo utilisé est de marque UVP, type TM 40 (U.S.A.). Le film Polaroid est de type 667 (3 000 ASA).

3/ Transfert sur nitrocellulose

- Transfert sur la nitrocellulose (Biorad, 162-0115) une nuit (travailler avec des gants)

*remplir un bac de SSC 10 x RF jusqu'à la moitié

*déposer sur le bac une plaque de verre

*trempier une feuille de papier Whatman (N°1, 3001.917) dans le SSC 10 x et le déposer sans bulle sur la plaque de verre de façon à ce que les extrémités baignent dans le SSC

*renverser le gel sur le papier (côté puits contre le papier)

*couper un morceau de nitrocellulose aux dimensions du gel, le tremper dans du SSC10 x, la déposer sur le gel

*couper deux morceaux de papier Whatman aux dimensions du gel, les tremper dans SSC 10x et les déposer sur la nitrocellulose

*mettre du parafilm sur la plaque de verre autour du gel pour éviter l'évaporation

*déposer des klinex sur le tout et un poids pendant 15-24 h

- Vérifier aux UV l'efficacité du transfert

- Sècher la nitrocellulose à T° ambiante entre 2 morceaux de papier Whatman, puis 2 h à 80°C et sous vide dans un sècheur de gel de marque Drygel Sr., type SE 1161 (U.S.A.). La pompe à vide est de marque ABM, type 83 cx-4 (Allemagne).

La nitrocellulose se conserve dans cet état

4/ Hybridation

NB : la solution de préhybridation = la solution d'hybridation moins la sonde.

- Composition du tampon : 1 % SDS (sodium dodécyl sulfate, Janssen 23.042.53)

10 % sulfate dextran

1 mol/l NaCl

- Préparation de la sonde : diluer la sonde biotinylée à 100 ng/μl à partir d'une solution de 1 μg/μl

Préhybridation

- Enfermer le filtre de nitrocellulose dans un sachet en plastique

- Ajouter 5 ml d'une solution de 1 % SDS

10% sulfate dextran

1 mol/l NaCl

- Préhybrider 15 min à 45°C dans un bain thermostatisé

hybridation

- Ajouter la sonde biotinylée (Eurogentec OL-0131) dénaturée après chauffage 2 min à 95°C à la solution de préhybridation :

5 μl d'une solution 100 ng/ml

- Ajouter le DNA salmon sperm (Sigma, D 1 626 type III) dénaturé : 50 μl d'une solution 100 μg/ml

- Hybridation une nuit à 45°C dans un bain thermostaté + agitation
- Lavages :
 - * 2 x 5 min à T° ambiante dans du SSC 2 x
 - * 2 x 15 min à 45°C dans du SSC 2 x + SDS 1 %
- Sècher les filtres sur papier Whatman

5/ Révélation

- Ajouter à la nitrocellulose 10 ml d'avidine-HRP mise en solution dans du tampon ELISA à raison de 60 µg/ml
- Incuber 1 h à T° ambiante
- Laver 3 x 15 min avec solution de lavage ELISA puis 7 x 2 min
- détection :
 - en spectrophotométrie :
 - incubation 5 min dans Tris-HCl 0,1 mol/l pH 7,6
 - révélation dans même tampon contenant 0,05 % de DAB (3-3 diaminobenzodine tétra HCl grad III, Sigma D 5 637) et H₂O₂ 0,03 %
 - Incubation 10 min à T° ambiante
 - en chémiluminescence :
 - incubation 10 min dans une mixture réactionnelle de 5 ml composée de :
 - *3,5 ml de tampon phosphate 0,2 mol/l pH 7,4 additionné de SAB 5 mg/ml.
 - *0,5 ml de luminol + p-phénylphénol
 - *1 ml d'H₂O₂ 0,03 %

CHAP. III RESULTATS ET DISCUSSIONS

A Dosage de la HRP en chémoluminescence

1. Présentation de l'enzyme

1) Caractéristiques

-stabilité : il est possible de conserver l'enzyme sous forme lyophilisée à 4 °C pendant plusieurs années. Elle reste stable pendant un an également en solution (1 mg/ml) dans du tampon phosphate 0,2 mole/l pH 7,4 à 4°C (Worthington, 1981).

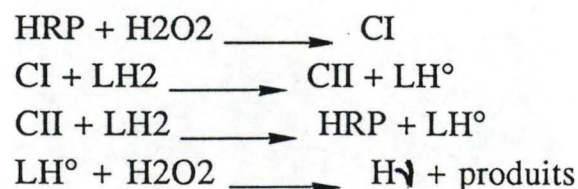
-elle absorbe à 280 nm comme toute protéine et à 405 nm car c'est une hémoprotéine

-elle a un PM de 45 000 daltons

-Structure : l'enzyme comporte deux domaines compacts entre lesquels l'hème est pris en sandwich.

2). Mécanismes de la réaction

Le mécanisme d'action de la HRP a été très étudié (Prichard et Cormier, 1968). La réaction a été divisée en une série d'étapes réprises ci-dessous :



avec LH₂ = luminol

CI et CII = complexe I et II de l'enzyme avec H₂O₂

Le complexe I représente l'association enzyme substrat entre le HRP et l' H_2O_2 . Le complexe II est le résultat d'une réduction du CI par un donneur d'électrons, le luminol. La libération de la HRP du CII se fait par une deuxième réduction. La conversion du CI en enzyme libre nécessite donc deux réductions successives.

Prichard et Cormier (1968), ont déterminé qu'une mole de luminol suffisait pour convertir le CI en HRP libre si une mole de HRP avait été incubée avec une mole d' H_2O_2 . Le luminol sert donc de donneur de deux électrons.

Ils ont également fait des courbes de concentration en luminol et en H_2O_2 à pH 8 en l'absence de HRP. Ils obtiennent une émission de lumière semblable à celle obtenue en présence d'enzyme à pH 7,4. Ceci suggère que l'émission de lumière est purement chimique et ne nécessite pas directement la présence de l'enzyme d'où le nom de chémoluminescence.

2. Essais préliminaires de dosage

1). Courbe de concentration en HRP

Matériel : les appareils de lecture utilisés sont :

- le bioluminomètre LUMAC Bioconter
- le bioluminomètre Turner 20
- l'appareil photo Polaroid

Méthode :

Nous avons fait varier la concentration en HRP de 0,01 mg/ml à 4 mg/ml afin de déterminer la concentration en enzyme qui donnerait le meilleur signal lumineux. Sur base du dosage mis au point par Alexandre (1988), nous avons utilisé les substrats aux concentrations suivantes : - H_2O_2 : 10^{-6} %
-luminol : 40 μ g/ml de tampon

La mise en solution est réalisée dans du tampon phosphate 0,2 mole/l pH 7,4.

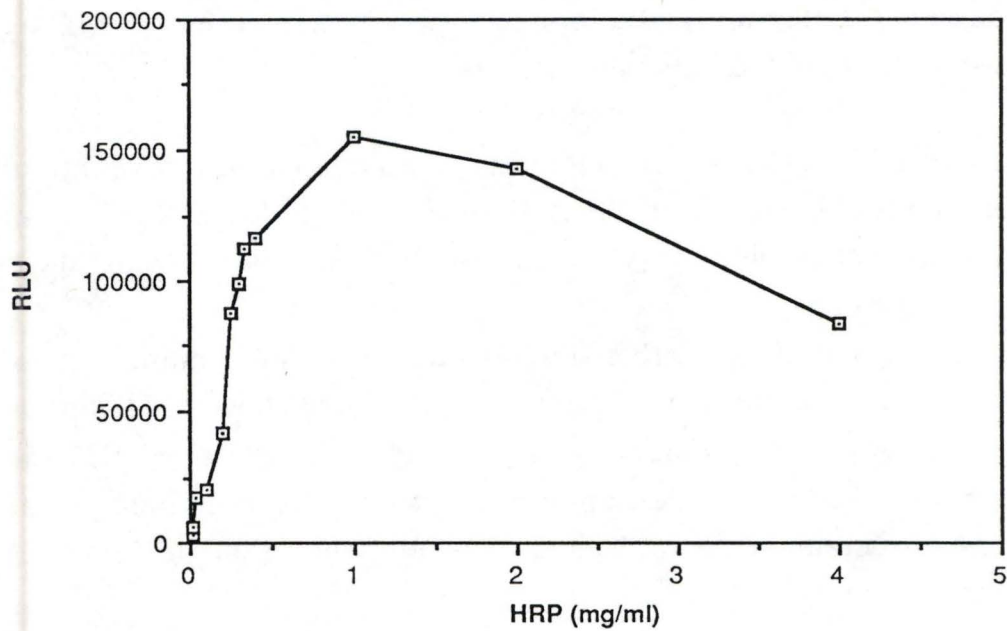


Fig. 27: Courbe de concentration en HRP

La concentration en H_2O_2 est de 10^{-6} % dans le test.

La concentration en luminol est de $40 \mu\text{l/ml}$ dans le test.

L'activité de la HRP est mesurée en luminescence (maximum) et est exprimée en RLU (Relative Light Unit).

L'émission lumineuse est enregistrée de deux manières :

-dans les tubes d'un bioluminomètre : mesure de la RLU (unité relative de lumière)

Les volumes de réactifs utilisés sont : 340 μ l de tampon, 100 μ l de H₂O₂, 50 μ l de luminol et 10 μ l de HRP.(la capacité maximum des tubes étant de 500 μ l).

-par prise d'une photo dans une boîte Polaroid. Les réactif sont placés dans des plaques multipuits (utilisées pour les ELISA) immobilisées dans l'appareil photo. Les volumes des réactifs sont à adapter à la capacité maximum des plaques multipuits (200 μ l). Cette méthode simple de détection de la lumière est semi quantitative, rapide et économique. Elle permet de visualiser la présence ou l'absence d'une enzyme. Par contre, elle ne permet pas une mesure précise de sa concentration mais seulement une estimation de celle-ci.

Résultats :

Nous observons que la valeur la plus élevée est obtenue pour une concentration en HRP de 1 mg/ml (fig. 27).

Aux plus faibles concentrations, la production de lumière diminue très rapidement. L'enzyme est donc limitante.

Un excès d'enzyme provoque une diminution du signal lumineux. Ceci pourrait s'expliquer par le phénomène de quenching : une concentration élevée en HRP générerait un écran qui absorberait une partie du signal lumineux émis.

la photo polaroid nous montre que le signal lumineux chute rapidement lorsqu'on diminue la concentration en HRP (fig. 28).



Fig. 28 : Courbe de concentration de la HRP

L'activité est mesurée en luminescence à l'aide d'une photo Polaroid 20 000 ASA.

Les concentrations en HRP sont :

- 1 mg/ml dans le puits 1
- 100 μ g/ml dans le puits 2
- 50 μ l/ml dans le puits 3
- 25 μ l/ml dans le puits 4
- 12,5 μ l/ml dans le puits 5
- 6,25 μ l/ml dans les puits 6

Les tests sont comparés à un blanc aux puits 7 et 8.

La concentration en $H_2O_2 = 10^{-6} \%$

La concentration en luminol = 40 μ g/ml

2). courbe de concentration en H₂O₂

Matériel : l'appareil de mesure utilisé est le bioluminomètre LUMAC.

Méthode :

Nous avons fait varier la concentration en H₂O₂ de 10⁻⁸ % à 3.10⁻² %.

La concentration des autres réactifs est la suivante :

-HRP : 1mg/ml (concentration optimale)

-luminol : 40 µg/ml

Résultats (fig. 29)

Nous constatons que la concentration optimale en H₂O₂ est de 3.10⁻² %.

Pour de plus faibles concentrations, le signal lumineux diminue et H₂O₂ devient le facteur limitant la réaction.

Pour de plus fortes concentrations, on observe ni augmentation ni diminution du signal lumineux mais l'installation d'un plateau. La concentration en H₂O₂ n'est plus le facteur limitant. Le fait d'augmenter la concentration en H₂O₂ produit une augmentation de l'intensité du signal lumineux mais au delà d'une certaine valeur (3.10⁻² %), le fait d'augmenter la concentration en H₂O₂ ne modifie plus la production de lumière. On est arrivé à V max, c'est l'enzyme qui est le facteur limitant la réaction.

3) Courbe de concentration en luminol.

Matériel : l'appareil de mesure utilisé est le bioluminomètre LUMAC.

Méthode :

Nous avons fait varier la concentration en luminol de 1 mg/ml à

6,25 µg/ml pour deux concentrations en HRP (1 mg/ml et 0,1 mg/ml).

La concentration en H₂O₂ est de 3.10⁻² %.

Résultats (fig. 30):

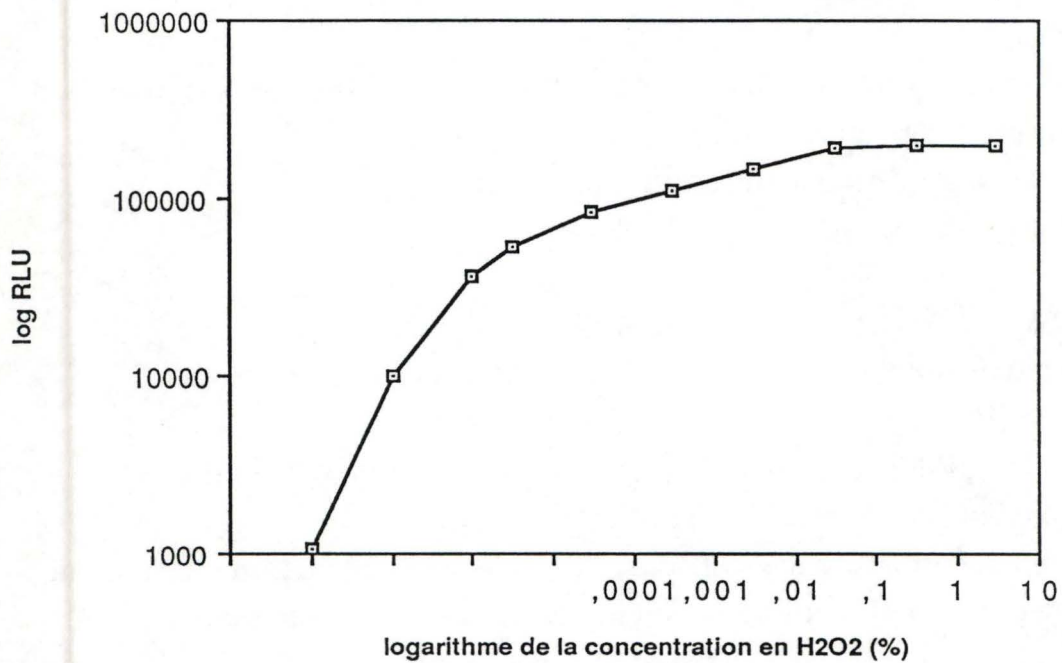


Fig 29 : Courbe de concentration en H2O2 dans le système de dosage de la HRP

La concentration en HRP est de 1 mg/ml dans le test (concentration optimale).

L'activité est mesurée en luminescence et est exprimée en RLU (Relative Light Unit).

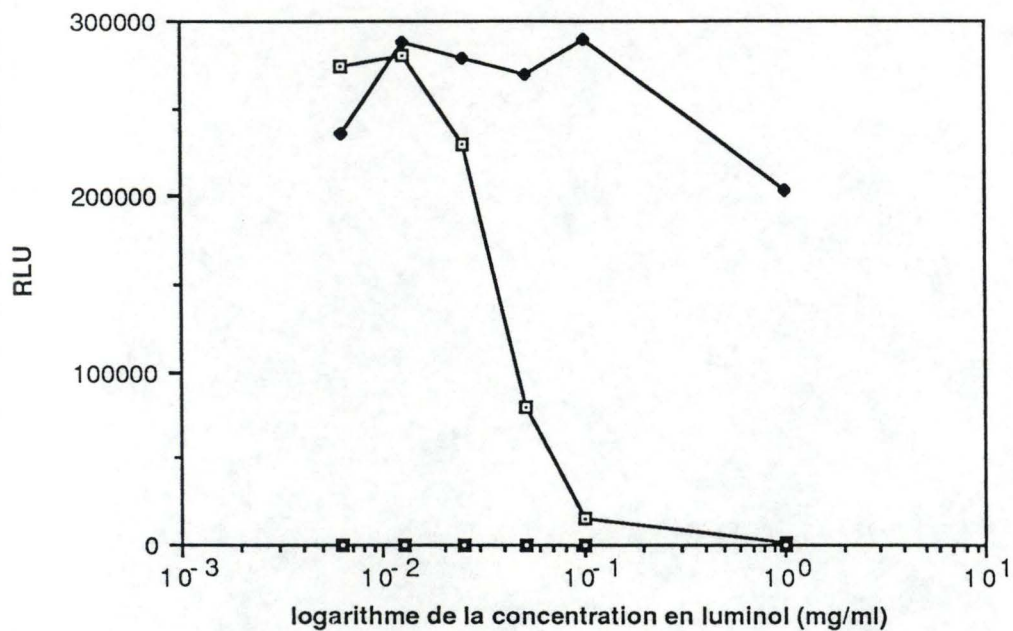


Fig. 30 : Courbe de concentration en luminol dans le système de dosage de la HRP

La concentration en HRP est de 1 mg/ml (-□-) et de 0,1 mg/ml (-◆-).

La concentration en H₂O₂ est de 3.10⁻² % (concentration optimale).

Les tests sont comparés à des blancs comprenant tous les réactifs sauf la HRP (-□-).

L'activité est mesurée en luminescence (RLU).

-Nous constatons que la concentration optimale en luminol est de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (pour une concentration en HRP de 1 mg/ml) et de 100 $\mu\text{g/ml}$ (pour une concentration en HRP de 0,1 mg/ml).

-Pour de plus fortes concentrations en luminol nous observons une diminution du signal lumineux pouvant même être totalement inhibé (concentration en luminol et en HRP de 1 mg/ml).

Le luminol employé à forte concentration semble inhiber la production de lumière. La raison de cette inhibition n'est pas claire.

-Nous constatons l'installation d'un plateau à de plus faibles concentrations.

Nous avons choisi d'utiliser le luminol à la concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ dans la suite des expériences car à cette concentration il n'est pas limitant

3. Etude de la mise au point du dosage de la HRP en chémoluminescence

Le dosage de la HRP a été réalisé ci-dessus à une concentration enzymatique élevée (1 mg/ml). Or, le but de ce travail est de révéler l'hybridation d'une sonde en chémoluminescence, il était donc nécessaire d'augmenter la sensibilité du dosage de la HRP pour pouvoir détecter la sonde.

1) Matériel

L'appareil de mesure utilisé est le bioluminomètre Turner 20. Cet appareil enregistre en continu plusieurs valeurs :

-le "full" = intégration délimitée par la courbe pendant le temps de lecture fixé

-le "half" = intégration pendant la première moitié de ce temps

-le "peak" = maximum de la courbe.

La réaction démarre par ajout au temps 0 de 100 μl d' H_2O_2 (grâce à un injecteur automatique placé sur le luminomètre).

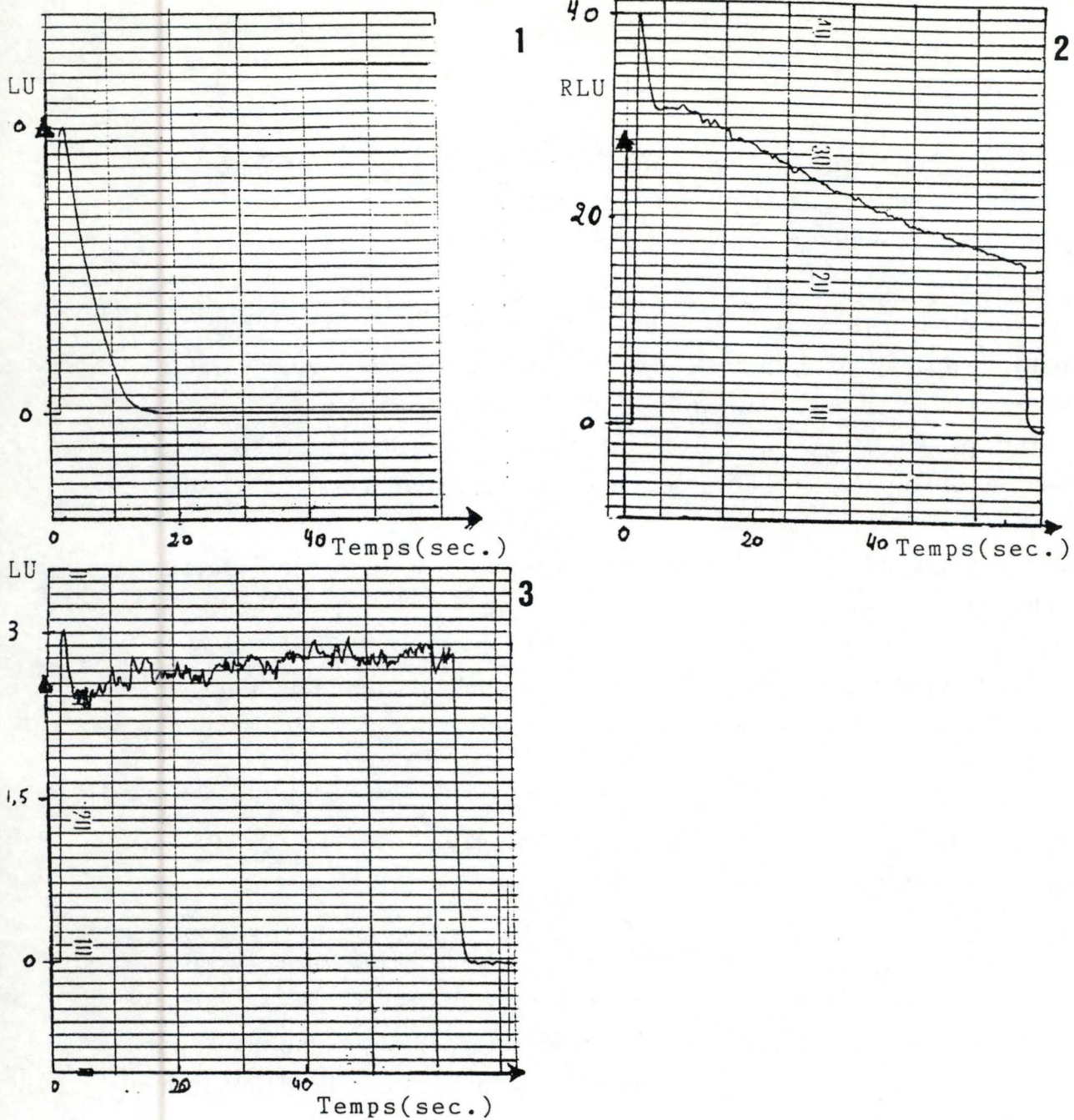


Fig. 31 : Profil d'émission de la lumière en fonction de la concentration en HRP

L'intégration du signal lumineux produit est mesurée au cours d'1 min.

Les concentrations en HRP sont : 1 mg/ml (1)
 100 µg/ml (2)
 10 µg/ml (3)

La concentration en H_2O_2 est de $3 \cdot 10^{-2}$ %.

La concentration en luminol est de 40 µg/ml.

Les concentrations en H_2O_2 et en luminol seront toujours les mêmes dans la suite des résultats et ne seront donc plus spécifiées.

2) Détermination du profil d'émission de la lumière

Nous avons tout d'abord déterminé le profil d'émission de la lumière en fonction de la concentration en HRP. L'intégration est mesurée pendant une minute. Les réactifs sont utilisés à des concentrations suffisamment élevées pour ne pas être limitants.

Nous avons mesuré le signal lumineux produit pour 3 concentrations en HRP : 1 mg/ml, 100 μ g/ml et 10 μ g/ml.

Afin de suivre l'enregistrement du signal lumineux dès le début de la réaction, nous avons utilisé un injecteur automatique qui déclenche l'intégration au moment de l'ajout du dernier réactif.

Résultats (fig. 31):

-Pour une concentration en HRP de 1 mg/ml, l'émission de lumière est instantanée et se termine après 30 sec.

-Pour une concentration en HRP de 100 μ g/ml, le signal s'atténue, mais il tend à se prolonger dans le temps.

-Pour une concentration en HRP de 10 μ g/ml, le signal est produit de façon continue et avec la même intensité au cours du temps.

Intérêt : -le signal étant continu au cours d'une min d'intégration, on peut augmenter le temps d'intégration et ainsi amplifier le signal émis. Si on intègre sur 10 min, la perte de signal due au mélange des réactifs devient négligeable.

-le signal étant prolongé dans le temps, on peut aussi simplifier le système de détection au maximum (utilisation de l'appareil photo Polaroid).

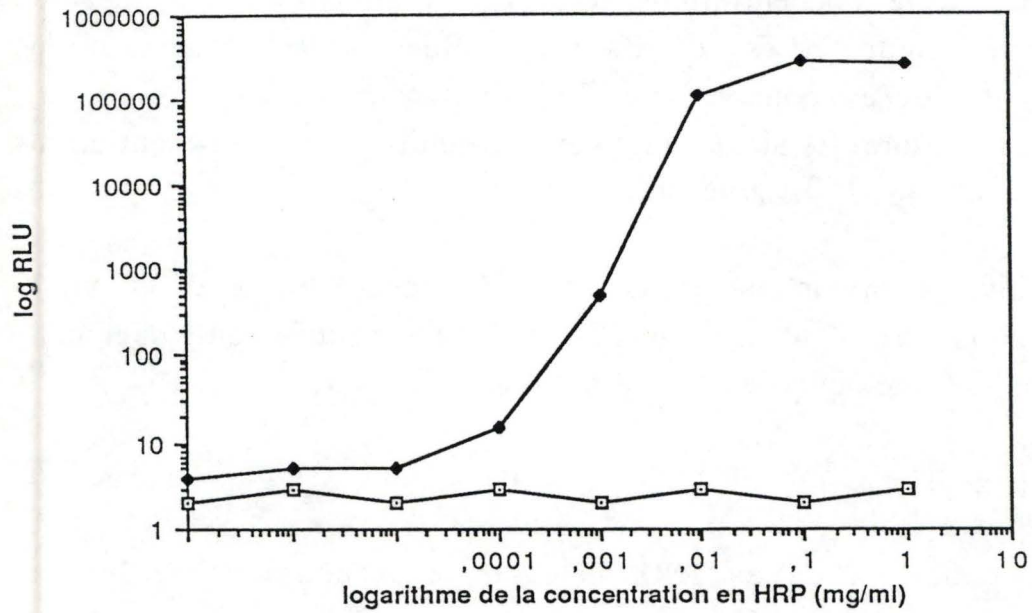


Fig. 32 : Courbe de dosage de la HRP en luminescence (●)

Le blanc ne comporte pas de HRP (□).

La mesure de l'activité est réalisée en luminescence. Le signal est intégré sur une minute et est exprimé en RLU.

3) Sensibilité du dosage de la HRP en chémoluminescence

Nous avons mesuré l'activité de la HRP pour différentes concentrations en enzyme. Les autres réactifs sont utilisés à des concentrations élevées de telle sorte que la concentration en enzyme soit le seul facteur limitant la réaction.:

-H₂O₂ : $3 \cdot 10^{-2}$ %

-luminol : 40 µg/ml

Nous avons utilisé deux systèmes de détection en parallèle :

-lecture de l'intégration du signal lumineux dans un bioluminomètre au cours d'une minute

-prise de photo avec exposition pendant 10 min

Résultats :

La limite de sensibilité est la même dans les deux cas. On peut détecter la HRP à une concentration minimale de 0,1 µg/ml (fig. 32) et de 1 µg/ml en photographie (fig. 33).

Sous cette valeur, la HRP n'est plus détectable.

L'intérêt du dosage en chémiluminescence est qu'en théorie il est plus sensible que le dosage en lumière visible (spectrophotométrie).

Nous avons donc fait une comparaison de la sensibilité du dosage selon ces deux méthodes.

4) Comparaison de la sensibilité du dosage de la HRP en chémoluminescence et en spectrophotométrie

Matériel :

Le luminomètre Turner 20 (la capacité maximum des tubes est de 500 ml) et le spectrophotomètre lecteur de plaque sont utilisés.

NUMERO DU PUIITS.

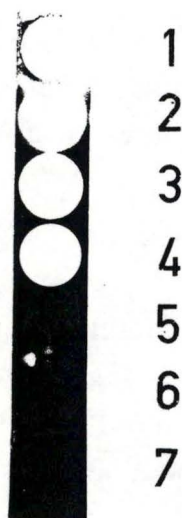


Fig. 33 : Courbe de concentration de la HRP après optimalisation des concentrations en substans

L'activité est mesurée en luminescence à l'aide d'une photo Polaroid 20 000 ASA.

Les concentrations en HRP sont de : 1 mg/ml dans le puits 1
100 μ g/ml dans le puits 2
10 μ g/ml dans le puits 3
1 μ g/ml dans le puits 4
100 ng/ml dans le puits 5

Les tests sont comparés à un blanc aux puits 6 et 7.

Méthode :

Nous avons mesuré l'activité de la HRP à différentes concentrations selon les deux méthodes :

Pour la révélation en chémoluminescence, nous avons utilisé comme réactifs le luminol (40 $\mu\text{g/ml}$) et H_2O_2 ($3 \cdot 10^{-2} \%$).

Pour la révélation en spectrophotométrie, les réactifs utilisés sont :

-l'ABTS : 2 mg mis en solution dans 3 ml de tampon citrate

- H_2O_2 30 % : 2,5 μl

50 μl de cette solution ont été déposés par puits.

Résultats (fig. 34):

La limite de détection est la même dans les deux cas. Elle est de , 1 $\mu\text{g/ml}$ soit 10^{-9} g/test (10 ml), ce qui représente $2 \cdot 10^{-14}$ mole/test La sensibilité étant semblable en spectrophotométrie, il nous fallait examiner s'il était possible d'augmenter la sensibilité du dosage en chémoluminescence. Sans quoi, l'utilisation de la chémoluminescence ne présenterait aucun avantage sur la spectrophotométrie.

5) Amélioration de la sensibilité en chémoluminescence1° Dissolution du luminol dans du DMSO

Le luminol étant insoluble dans le tampon, nous l'avons dissout au préalable dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le DMSO est un solvant permettant la solubilisation des substances apolaires.

Nous pensions améliorer, par cette dissolution, la capacité réactionnelle du luminol.

Matériel : le luminomètre LUMAC

Méthode : -nous avons fait une courbe de concentration en luminol avec et sans DMSO. Ce test a été réalisé pour deux concentrations en HRP : 1 mg/ml et 0,1 mg/ml.

La concentration en H_2O_2 est de $3 \cdot 10^{-2} \%$

-nous avons fait une courbe de concentration en HRP avec et sans DMSO.

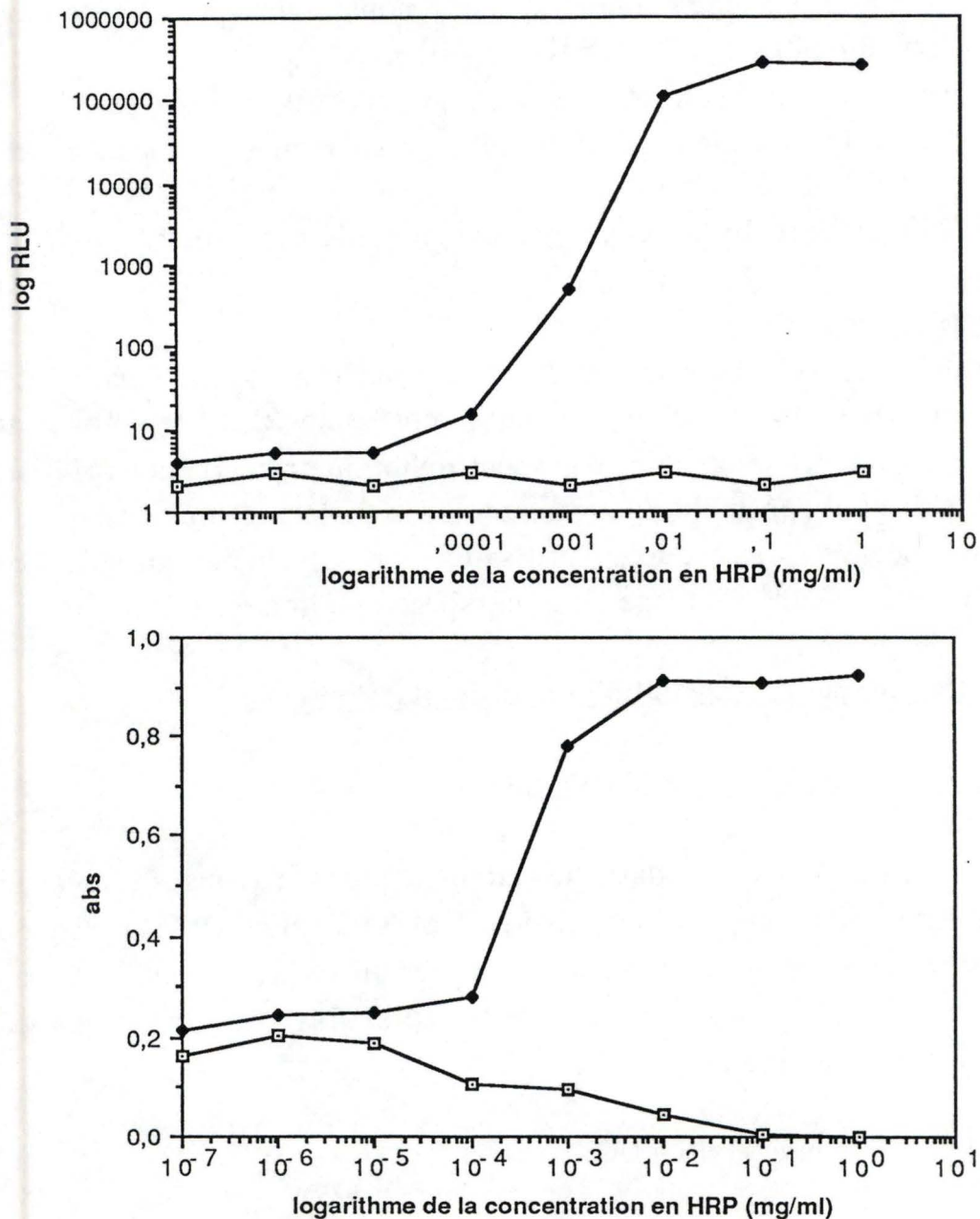


Fig. 34 : Comparaison de la sensibilité du dosage de la HRP en luminescence (RLU) et en spectrophotométrie (Abs à 405 nm). On a utilisé 10 μ l de la préparation de HRP dans 500 μ l pour la chémoluminescence et dans 50 μ l pour la spectrophotométrie (●).

Les concentrations en substrats en spectrophotométrie sont :

-ABTS : 0,67 mg/ml

-H₂O₂ : 3.10⁻² %

Les blancs ne comportent pas de HRP (□).

Les concentrations en substrats sont : -40 $\mu\text{g/ml}$ de luminol
- 3.10^{-2} % d' H_2O_2

Résultats (fig. 35 et 36):

L'utilisation de DMSO n'apporte pas d'amélioration de la sensibilité mais plutôt une diminution plus rapide de la partie descendante de la courbe .

On peut en déduire que le DMSO est toxique à forte concentration.dans le test. On remarque également l'inhibition de l'activité de la peroxydase lorsque l'enzyme se trouve à forte concentration.

Nous avons alors pensé améliorer la sensibilité du dosage en utilisant un enhancer.

2° Amplification du signal par un enhancer

Le 6-hydroxy benzothiazole, certains dérivés phénol (para-iodophénol, para-phénylphénol) et dérivés aminés sont capables d'augmenter l'intensité du signal lumineux produit ainsi que sa prolongation dans le temps (Thorpe et Kricka,1985).

L'avantage de ce système est double :

-rapidité de la détection : l'augmentation de l'intensité et la prolongation du signal permet de déterminer la concentration en HRP en quelques secondes alors qu'il faut en général plusieurs minutes dans les mesures colorimétriques.

-simplification de l'équipement requis : la prolongation du signal permet la simplification des équipements ainsi que des applications de routine. De plus, il n'est pas nécessaire de mélanger rapidement les réactifs avant lecture.

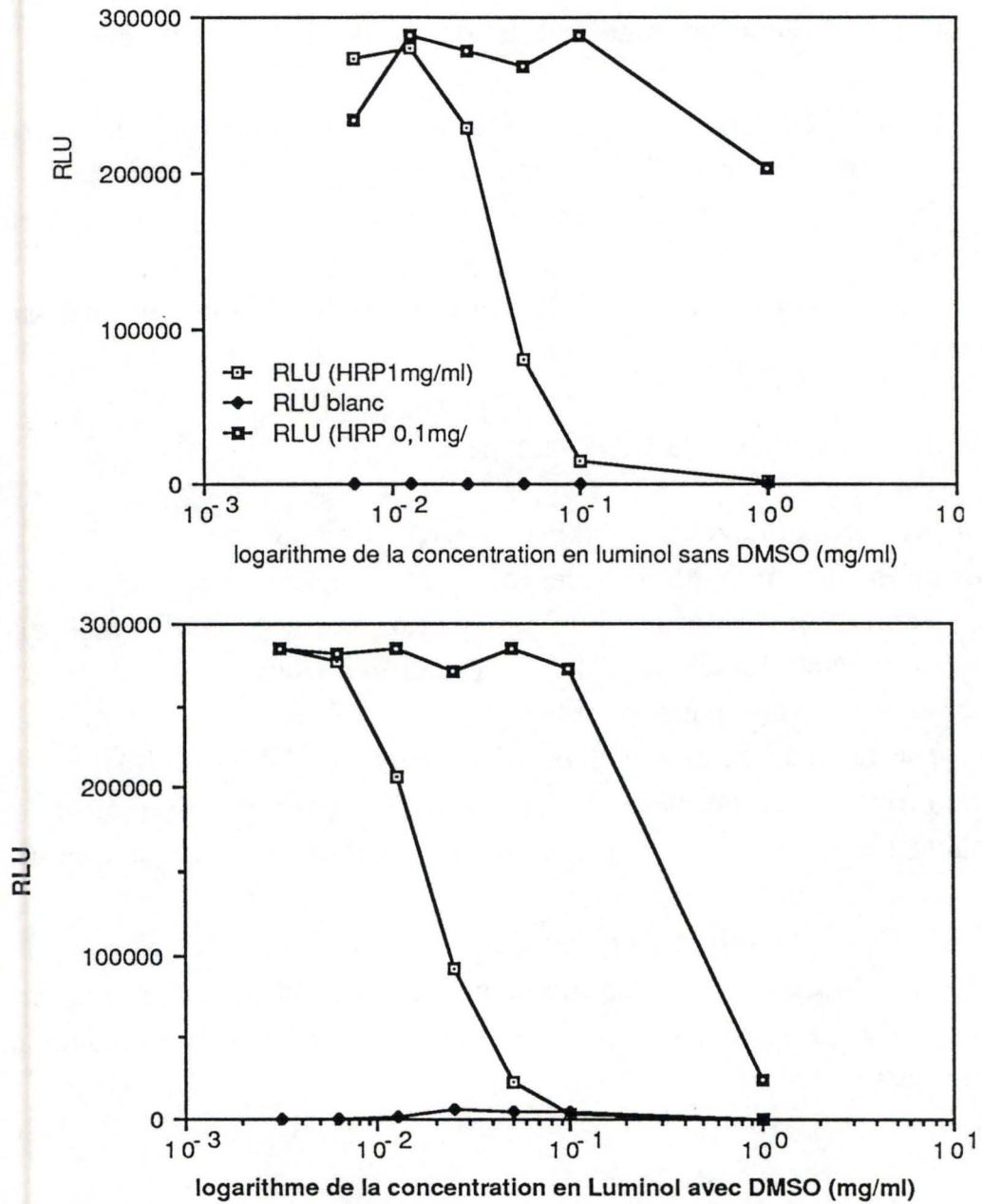


Fig. 35 : Courbe de concentration en luminol avec et sans DMSO
 Les concentrations en HRP sont : 1 mg/ml et 0,1 mg/ml.
 Les blancs ne comportent pas de HRP.
 L'activité exprimée en RLU correspond au maximum dans la cinétique de production de lumière.

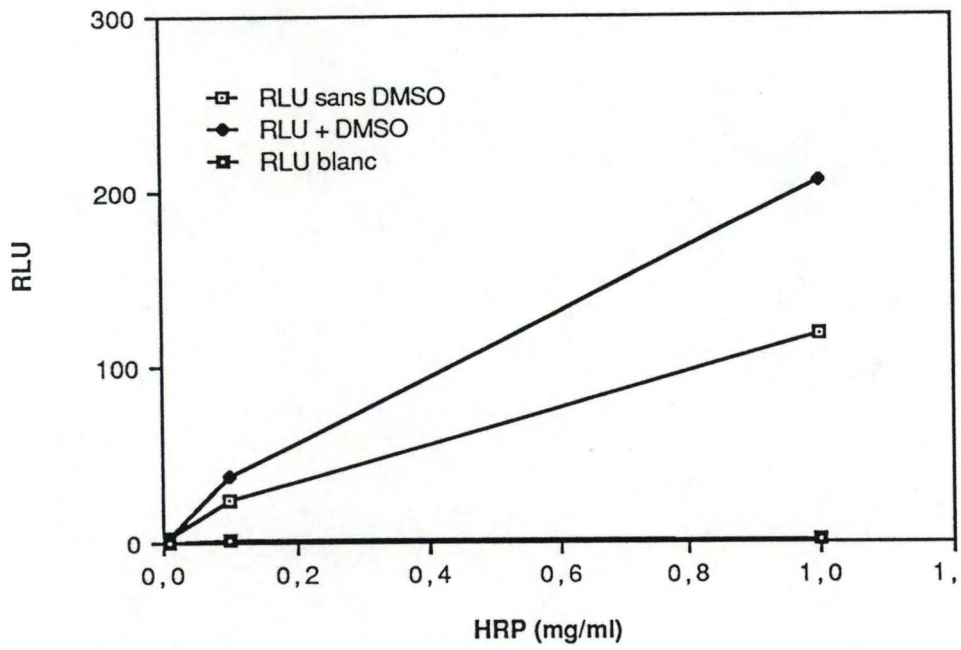
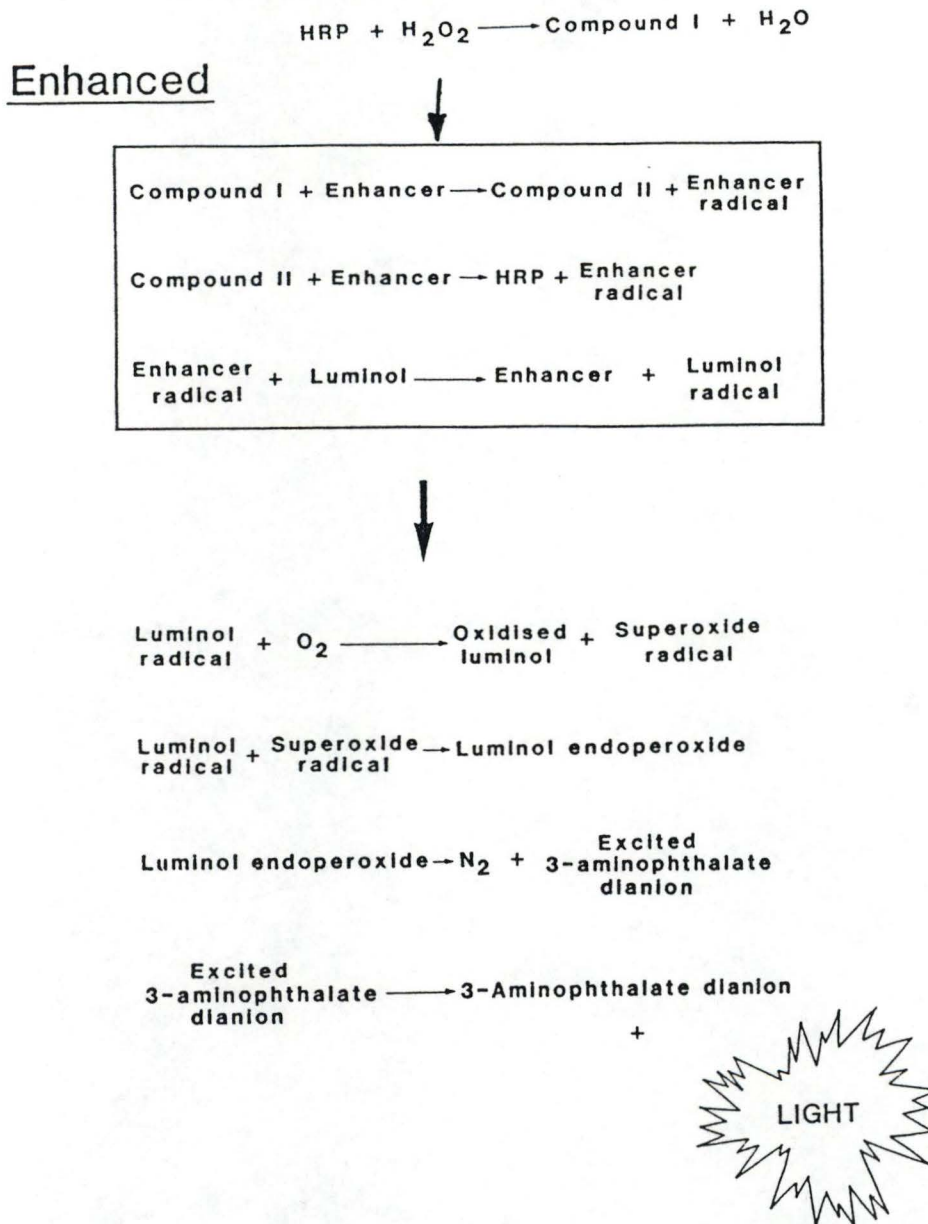


Fig. 36 : Courbe de concentration en HRP avec et sans DMSO

Les blancs ne comportent pas de HRP.

L'activité exprimée en RLU correspond au maximum dans la cinétique de production de lumière.

Le mécanisme de la réaction est le suivant :



L'augmentation de signal n'est donc pas due au fait que les enhanceurs agissent comme émetteurs plus efficaces mais parce qu'ils agissent au niveau des étapes de la réaction précédant l'émission de lumière.

Nous avons utilisé le p-phénylphénol (PPP) comme enhanceur car l'augmentation de signal est en général meilleure avec les dérivés phénols plutôt que les autres dérivés.

Matériel : le bioluminomètre Turner 20

Méthode :

Le PPP étant insoluble dans le tampon, il est au préalable mis en solution dans du DMSO à raison de 2 mg/ml, puis on réalise les dilutions dans la solution stock de luminol. Le test comporte 50 µl de luminol additionné de PPP.

Nous avons mesuré l'activité de la HRP pour différentes concentrations en PPP. La concentration en HRP choisie est de 100 ng/ml; cette valeur se situe sous le seuil de détection existant. Dès lors, si on améliore la sensibilité du dosage en utilisant le PPP, on devrait pouvoir détecter l'enzyme à cette concentration.

Résultats :

L'augmentation de l'intensité du signal lumineux est considérable mais elle est accompagnée d'un bruit de fond très élevé, même pour de fortes dilutions en enhancer.

Vu l'importance des blancs nous avons recommencé l'expérience plusieurs fois, en utilisant chaque fois de nouvelles solutions et en vérifiant le pH (à un pH supérieur à 8, il y a production de lumière même sans enzyme).

Nous avons malgré tout obtenu des résultats avec des blancs toujours aussi élevés.

Pensant que la sensibilité était limitée par l'inactivation de la HRP pour de fortes dilutions, nous avons alors essayé de stabiliser la HRP en solution.

3° Stabilisation de la HRP

Matériel : nous avons utilisé le bioluminomètre Turner 20 et l'appareil photo polaroïd.

Méthode :

Nous avons ajouté de la sérum albumine bovine (SAB) au tampon phosphate utilisé pour la mise en solution de l'enzyme et ce à différentes concentrations : 0,5 mg/ml, 5 mg/ml et 10 mg/ml. Le test comporte 340 µl de tampon additionné de SAB pour les tubes et 136 µl pour les plaques multipuits.

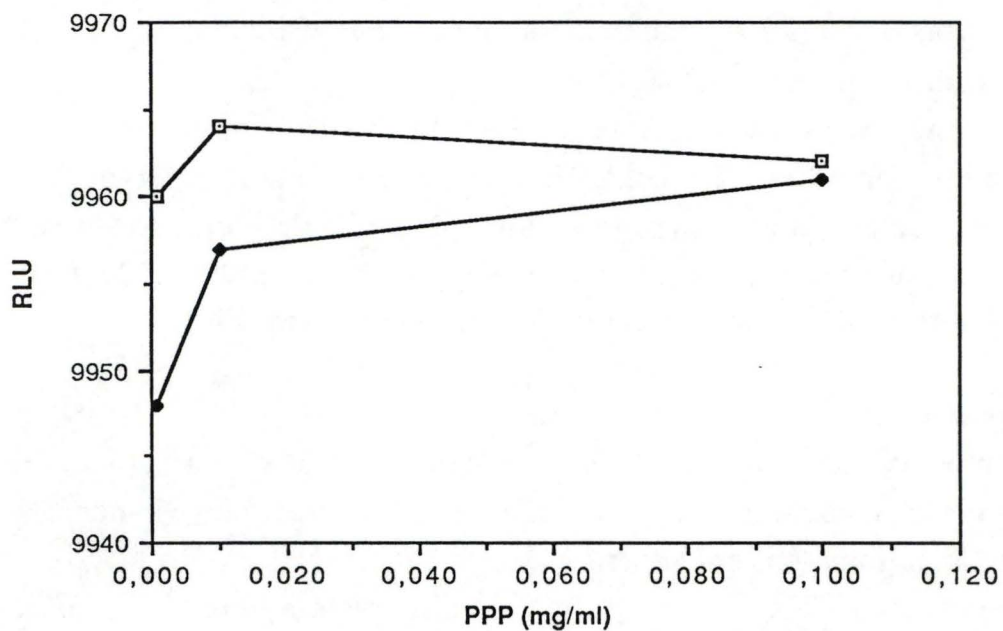


fig. 37 : Courbe de concentration en PPP pour une concentration en SAB de 0,5 mg/ml (-□-)

La concentration en HRP est de 100 ng/ml.

Les blancs ne comportent pas de HRP (-◆-).

La mesure de l'activité est réalisée en luminescence. Le signal est intégré sur une minute et est exprimé en RLU.

1) Pour chaque concentration en SAB nous avons mesuré la production de lumière en fonction de la concentration en PPP. Les concentrations en PPP sont : 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$. La concentration en HRP est fixée à 100 ng/ml

2) Sensibilité du dosage : pour chaque concentration en SAB, nous avons mesuré la production de lumière en fonction de la concentration en HRP.

Les concentration en HRP utilisées vont de 1 mg/ml à 0,1 ng/ml .

Les concentrations en luminol et en H_2O_2 sont toujours les mêmes.

La production de lumière a été mesurée de deux façons :

- dans les tubes d'un bioluminomètre
- en prenant une photo

Résultats :

1) Courbe de concentration en PPP

En général, le signal est d'autant meilleur que la concentration en PPP est élevée.

Cela avait déjà été montré par Thorpe et Kricka en 1985.

Cependant, à une concentration en SAB de 0,5 mg/ml , (fig. 37) les blancs sont presque aussi élevés que les tests. Par contre pour des concentrations en SAB plus élevées, les blancs sont très faibles (fig. 38).

L'explication de ce phénomène réside probablement dans la fixation du PPP par l'albumine qui diminue ainsi son interaction son spécifique avec H_2O_2 .

Les blancs étant fortement diminués en présence de SAB, nous allons pouvoir tester la sensibilité du dosage de la HRP en présence d'un enhancer et déterminer la concentration optimale en SAB à utiliser dans les tests.

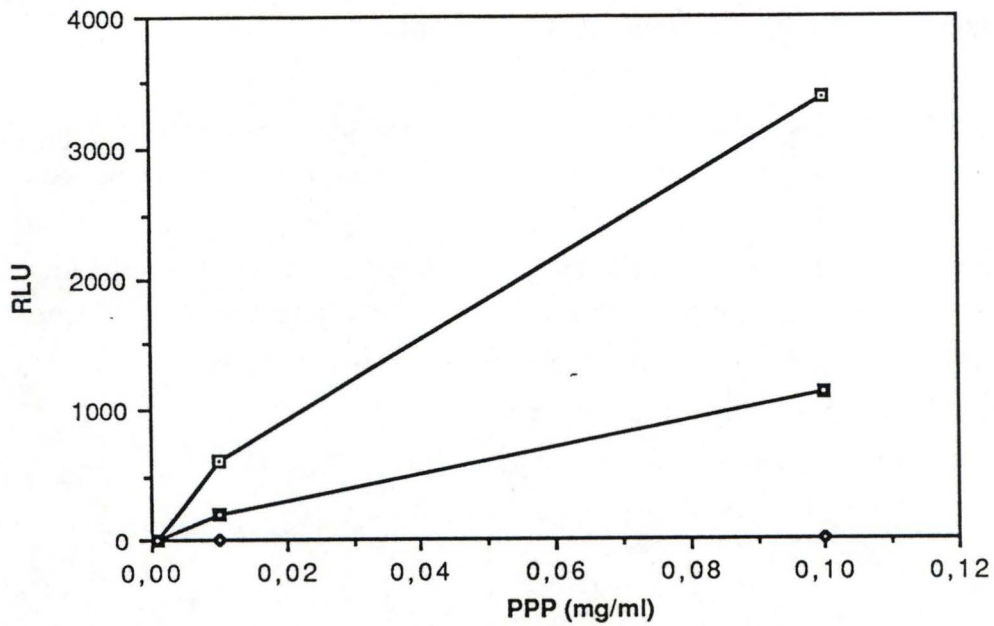


Fig. 38: Courbe de concentration en PPP pour les concentrations en SAB de 5 mg/ml (\square) et 10 mg/ml (\blacksquare)

La concentration en HRP est de 100 ng/ml.

Les blancs ne comportent pas de HRP (\blacklozenge).

La mesure de l'activité est réalisée en luminescence. Le signal est intégré sur une minute et est exprimé en RLU.

2) Courbe de concentration en HRP

-lecture au luminomètre

La concentration en SAB pour laquelle nous obtenons la plus grande différence entre les blancs et les tests est de 5 mg/ml (fig. 39 et 41).

A 10 mg/ml, nous constatons une légère diminution de l'intensité du signal par rapport à celui obtenu avec 5 mg/ml (fig. 40 et 41).

-Prise d'une photo (fig. 42) : les résultats obtenus sont similaires.

En utilisant de la SAB pour stabiliser la HRP à la concentration de 5 mg/ml, nous avons pu améliorer la sensibilité du dosage d'un facteur 100.

L'augmentation de la sensibilité est due à un meilleur rapport signal/bruit. Le fait que le bruit de fond soit fortement diminué par addition de SAB n'a pu être expliqué.

La concentration minimale en enzyme pouvant être détectée (seuil de détection) est de $2 \cdot 10^{-16}$ mole/test.

Le dosage ainsi mis au point est 100 fois plus sensible que celui en spectrophotométrie, d'où l'intérêt de la révélation en chémoluminescence.

4° Comparaison de la sensibilité du dosage en spectrophotométrie et en chémoluminescence après optimalisation en chémoluminescence

Nous avons mesuré l'activité de la HRP en spectrophotométrie et en chémoluminescence.

Nous avons utilisé 10 μ l de HRP dans les tests. Les concentrations en HRP vont de 1 mg/ml à 0,1 ng/ml.

Résultats (fig. 43):

Le résultat est bien celui escompté, le seuil de détection est 100 fois plus bas en chémoluminescence avec la possibilité de doser jusqu'à 1 ng de HRP dans la solution soit 0,01 ng dans le test soit $2 \cdot 10^{-16}$ mole/test (10 μ l).

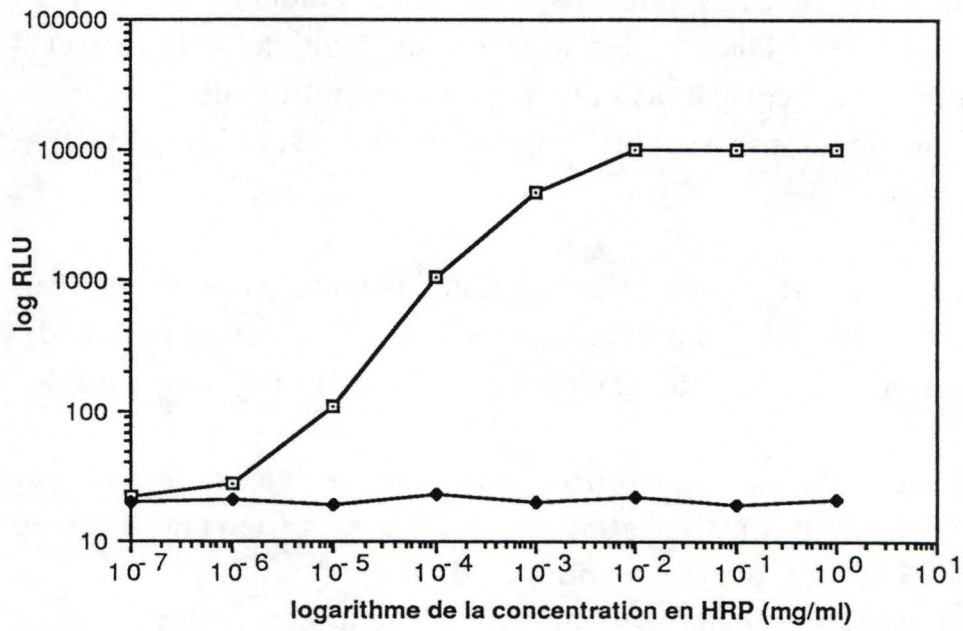


Fig. 39 : Courbe de concentration en HRP pour une concentration en SAB de 5 mg/ml (-□-)
 Les blancs ne comportent pas de HRP (-◆-).

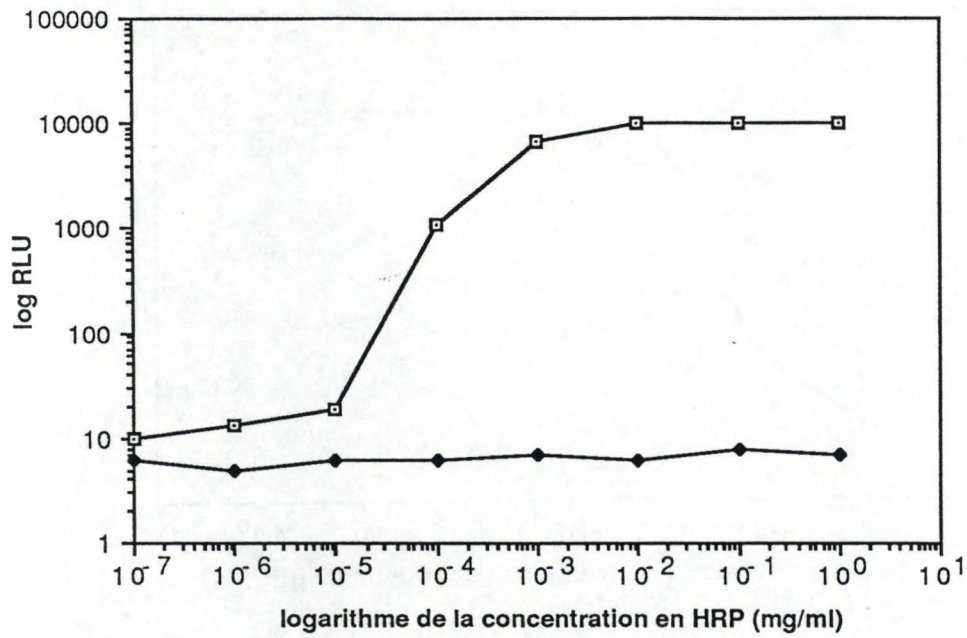


Fig. 40 : Courbe de concentration en HRP pour une concentration en SAB de 10 mg/ml (-□-)
 Les blancs ne comportent pas de HRP (-◆-).

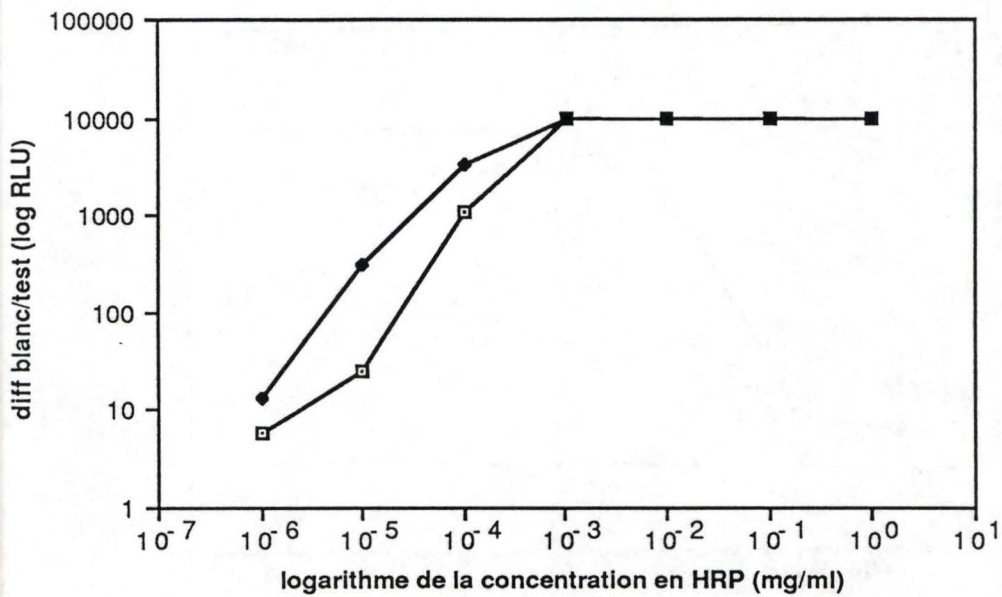


Fig. 41 : Effet de la concentration en SAB sur le rapport signal/bruit au cours du dosage de la HRP

Les concentrations en SAB sont 5 mg/ml (—■—) et 10 mg/ml (—□—).

La mesure de l'activité est réalisée en luminescence (intégration sur une minute).

Numéro du
puits.

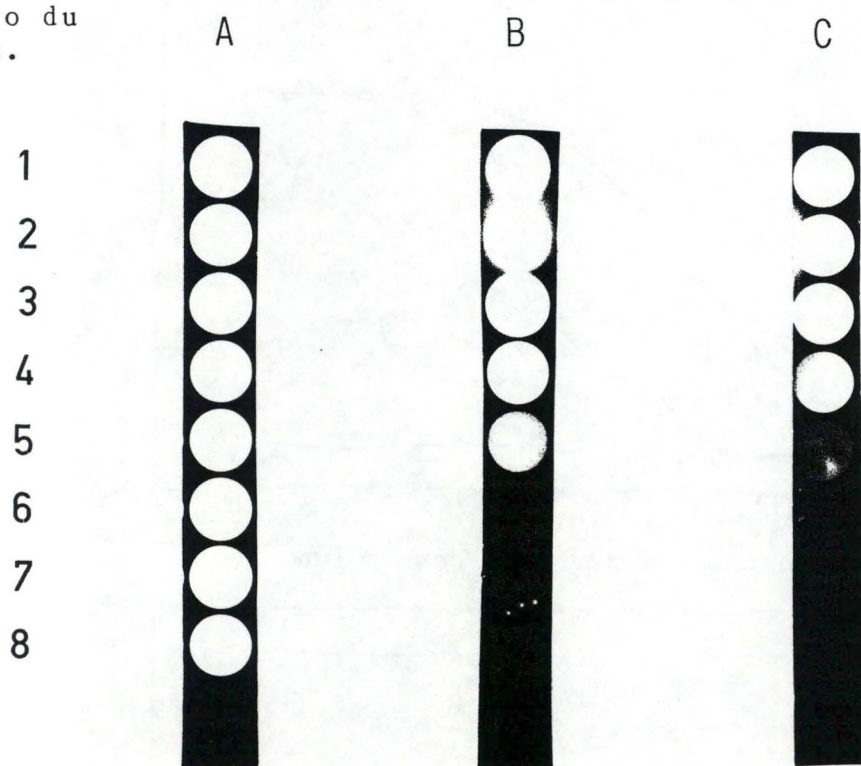


Fig. 42 : Effet de la concentration en SAB sur le dosage de la peroxydase

La mesure de l'activité est réalisée au moyen d'une photo polaroïd 20 000 ASA.

Les concentrations en SAB sont : 0,5 mg/ml (A)

5 mg/ml (B)

10 mg/ml (C)

Les concentrations en HRP sont : 100 µg/ml au puits 1

10 µg/ml au puits 2

1 µg/ml au puits 3

100 ng/ml au puits 4

10 ng/ml au puits 5

Les tests sont comparés à un blanc aux puits 6, 7 et 8.

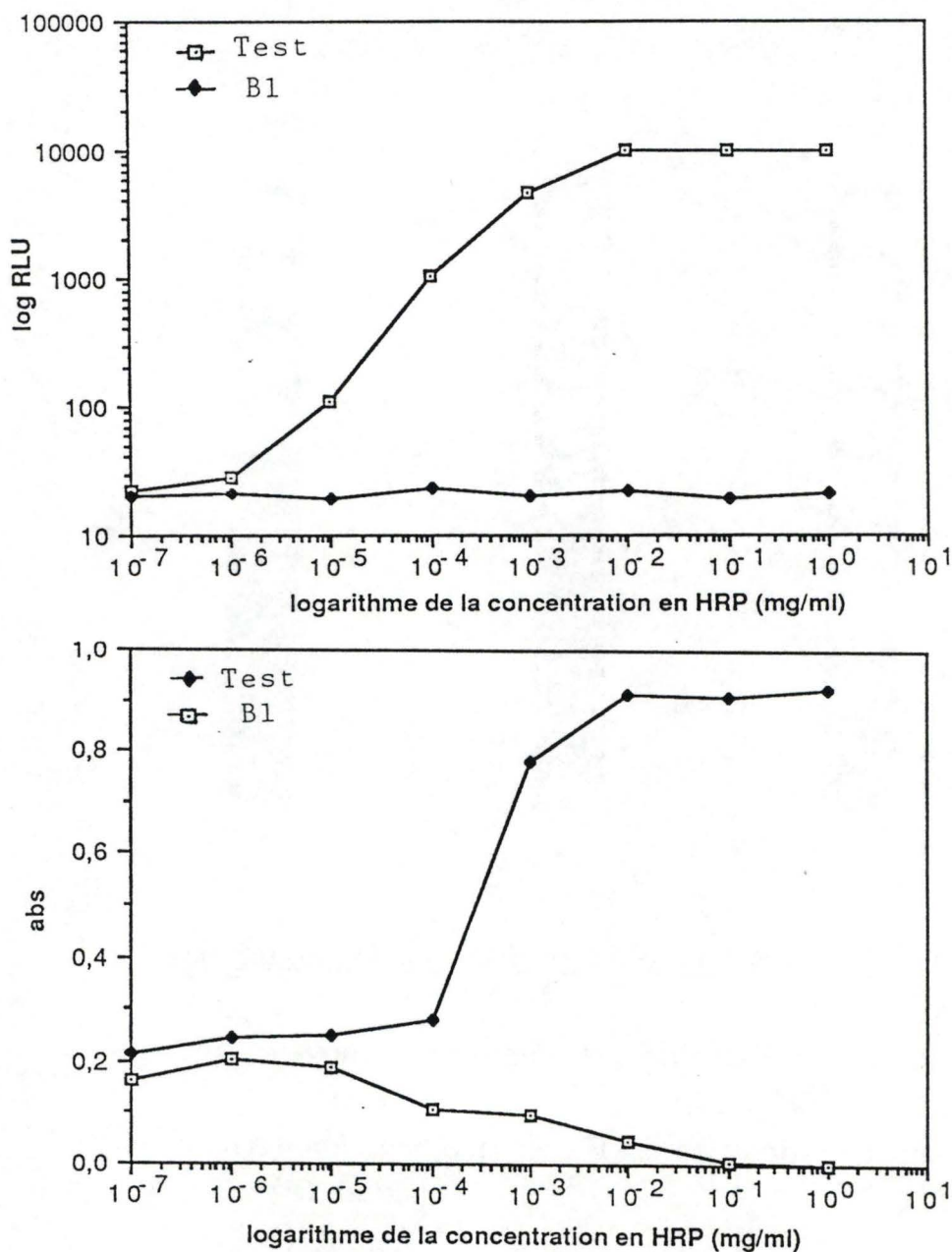


Fig. 43 : Comparaison de la sensibilité du dosage de la HRP en luminescence (RLU) et en spectrophotométrie (Abs. à 405 nm) après optimisation du dosage en luminescence.

Les concentrations en substrats en spectrophotométrie sont :

-ABTS : 0,67 mg/ml

-H₂O₂ : $3 \cdot 10^{-2}$ %

Les blancs ne comportent pas de HRP

Le système de détection de la HRP en chemoluminescence étant optimisé, nous avons alors étudié par quel moyen la HRP allait nous permettre de révéler l'hybridation de la sonde.

II. Mise au point du système de détection

A. fixation de la HRP sur la sonde

Nous avons d'abord pensé fixer la HRP directement sur la sonde et ensuite révéler l'enzyme après hybridation.

Or, l'hybridation se produit généralement pendant une nuit à une T° souvent comprise entre 50 et 60°C. Il était donc nécessaire de mesurer la stabilité de la HRP au cours du temps à une T° élevée (65°C) pour voir si l'enzyme fixée à la sonde résisterait aux conditions d'hybridation.

Nous avons mesuré l'activité enzymatique à différents temps :

0 h, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h.

Résultats (fig. 44):

L'activité de la HRP diminue exponentiellement en fonction du temps à une T° de 65°C.

Vu l'importance de la perte d'activité de l'enzyme au cours du temps, nous avons abandonné l'idée de fixer la HRP directement sur la sonde.

Nous avons alors envisager de fixer l'enzyme de façon indirecte sur la sonde au moyen de la paire avidine-biotine.

B. Fixation de la HRP sur une sonde biotinylée

Nous avons choisi la biotine comme molécule intermédiaire car les sondes biotinylées sont des sondes froides très couramment utilisées. De plus, la biotinylation des sondes a été bien étudiée dans la littérature.

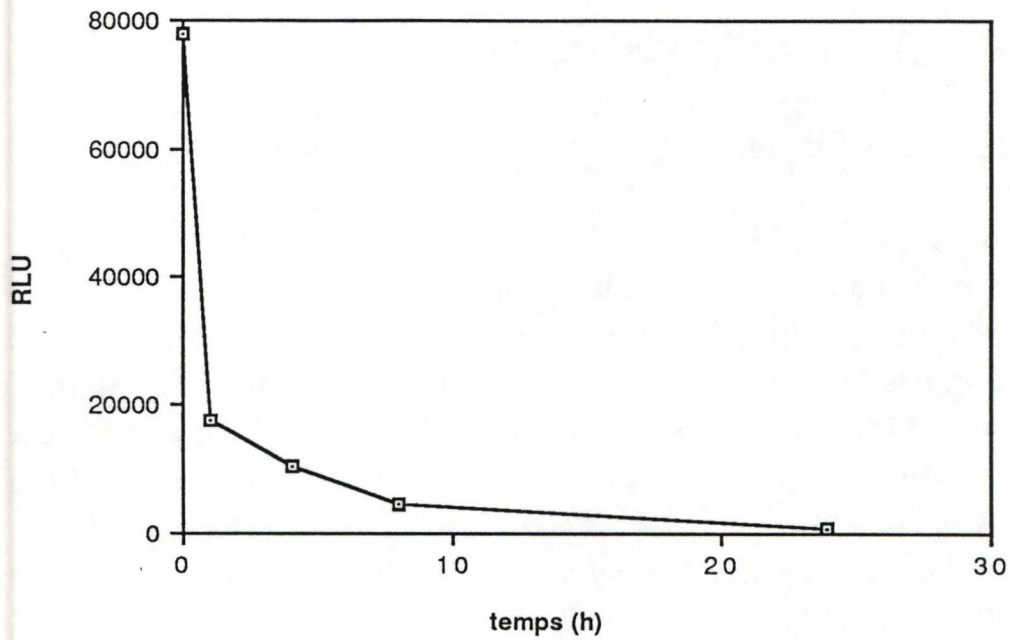
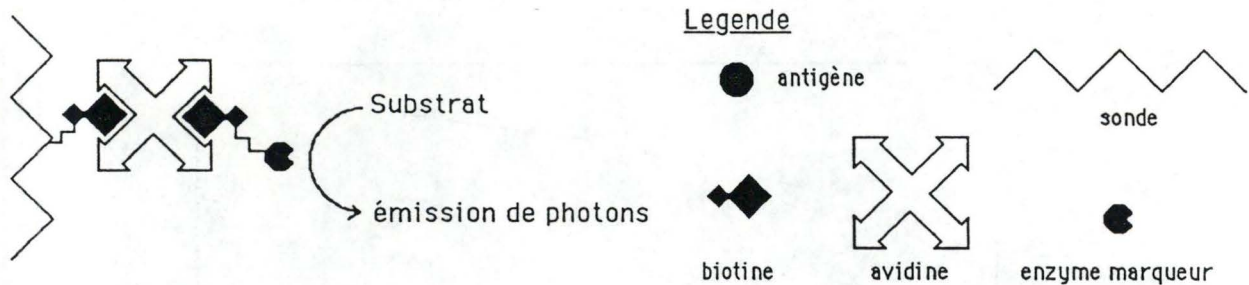


Fig. 44 : Courbe de stabilité de la HRP au cours du temps à une T° de 65 °C

L'activité exprimée en RLU correspond au maximum de la cinétique de production de lumière.

Principe :



- réaliser l'hybridation avec une sonde biotinylée
- fixer le complexe avidine-biotine-HRP sur la biotine de la sonde après hybridation
- révéler la HRP

Pour ce faire il fallait avant tout s'assurer de la fixation de la biotine sur la peroxydase.

Le mode opératoire utilisé pour coupler la biotine à la HRP a été mis au point au laboratoire. Il se base sur le couplage de la biotine à des immunoglobulines au niveau des groupements aminés.

Nous avons donc évité d'utiliser un tampon comprenant des fonctions amines qui pourraient entrer en compétition avec les fonctions amines de la HRP pour le couplage à la biotine.

Nous avons utilisé une quantité de peroxydase constante pour une quantité variable de biotine selon les rapports molaires suivants : 1/1, 1/10, 1/100.

Nous avons ensuite mesuré l'activité enzymatique après couplage, puis nous avons testé l'efficacité du couplage.

Résultats (fig. 45):

Nous constatons une faible perte d'activité après couplage.

Afin de vérifier l'efficacité du couplage, nous nous sommes basés sur l'affinité de la biotine pour l'avidine. L'avidine est une glycoprotéine dont l'affinité pour la biotine est connue depuis longtemps

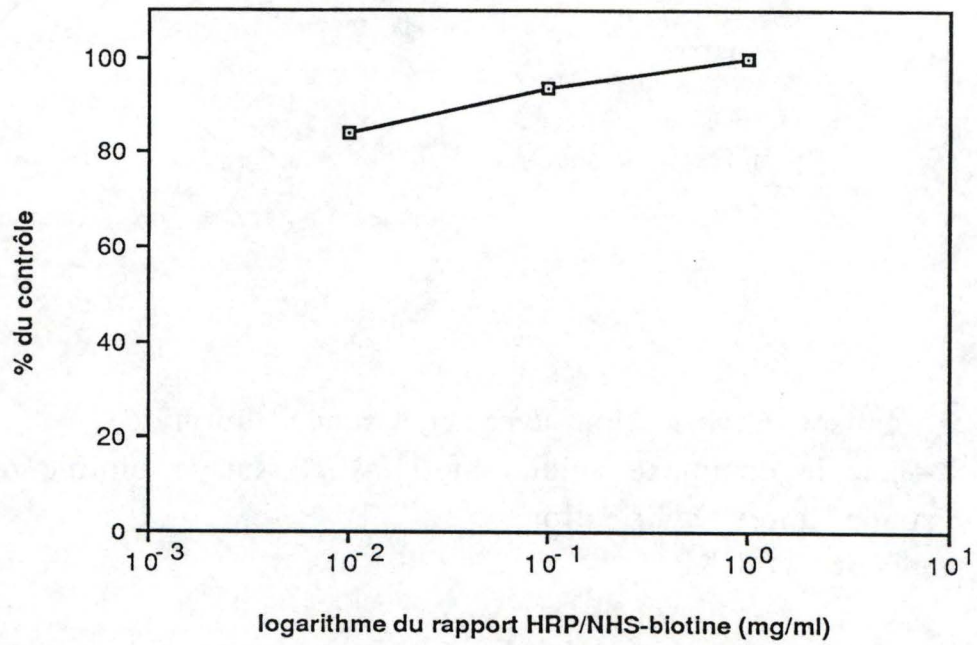


Fig. 45 : Mesure de l'activité de la HRP (en % du contrôle) après couplage pour différents rapports de concentration en HRP/NHS-biotine (1/1, 1/10, 1/100)

($K_d = 10^{-15}$ mol/l) (Green 1975, Guesdon 1979, Wilchek 1989).

Nous avons incubé pour chaque préparation un dixième du volume avec 100 μ l d'avidine à une concentration de 1 mg/ml pendant 2 h. à T° ambiante..

Si le couplage a bien eu lieu, l'avidine devrait se fixer sur la HRP marquée à la biotine et donner un conjugué de haut poids moléculaire.

On peut détecter les conjugués par injection sur HPLC. L'absorbance est lue à 280 nm (protéine) et à 405 nm car la HRP est une hémoprotéine dont l'hème absorbe à cette longueur d'onde.

Au préalable nous avons fait une droite d'étalonnage de la colonne de tamis moléculaire Superose 12 (1 x 30 cm) (fig. 46 et 47) dans le but de déterminer le PM des conjugués.

Nous avons également réalisé l'injection de HRP seule (fig. 49) d'une part et d'autre part d'avidine seule (fig. 48) afin de déterminer les temps auxquels ces protéines sont éluées.

On devrait normalement observer différents pics :

- à 280 nm : 1 pic de conjugué HRP-biotine-avidine
1 pic d'avidine seule
1pic de HRP seule
- à 405 nm : 1pic de conjugué HRP-biotine-avidine
1 pic de HRP seule

Résultats :

Nous n'avons obtenu qu'un seul pic à 405 nm (fig. 51) et un pic légèrement dédoublé à 280 nm (fig. 50) à un temps d'élution correspondant à l'avidine (42 min) et à la peroxydase (44 min).

La quantité plus ou moins importante de peroxydase à 44 min s'explique par des perte plus ou moins grandes dans les trois préparations (fig. 50 et 51).

Il semble bien que la conjugaison n'a pas eu lieu puisque nous n'observons pas de protéines de poids moléculaire plus élevé. Ce mode opératoire n'apparaît pas adéquat pour le couplage que nous avons réalisé alors qu'il est utilisé pour coupler la biotine à des IgG.

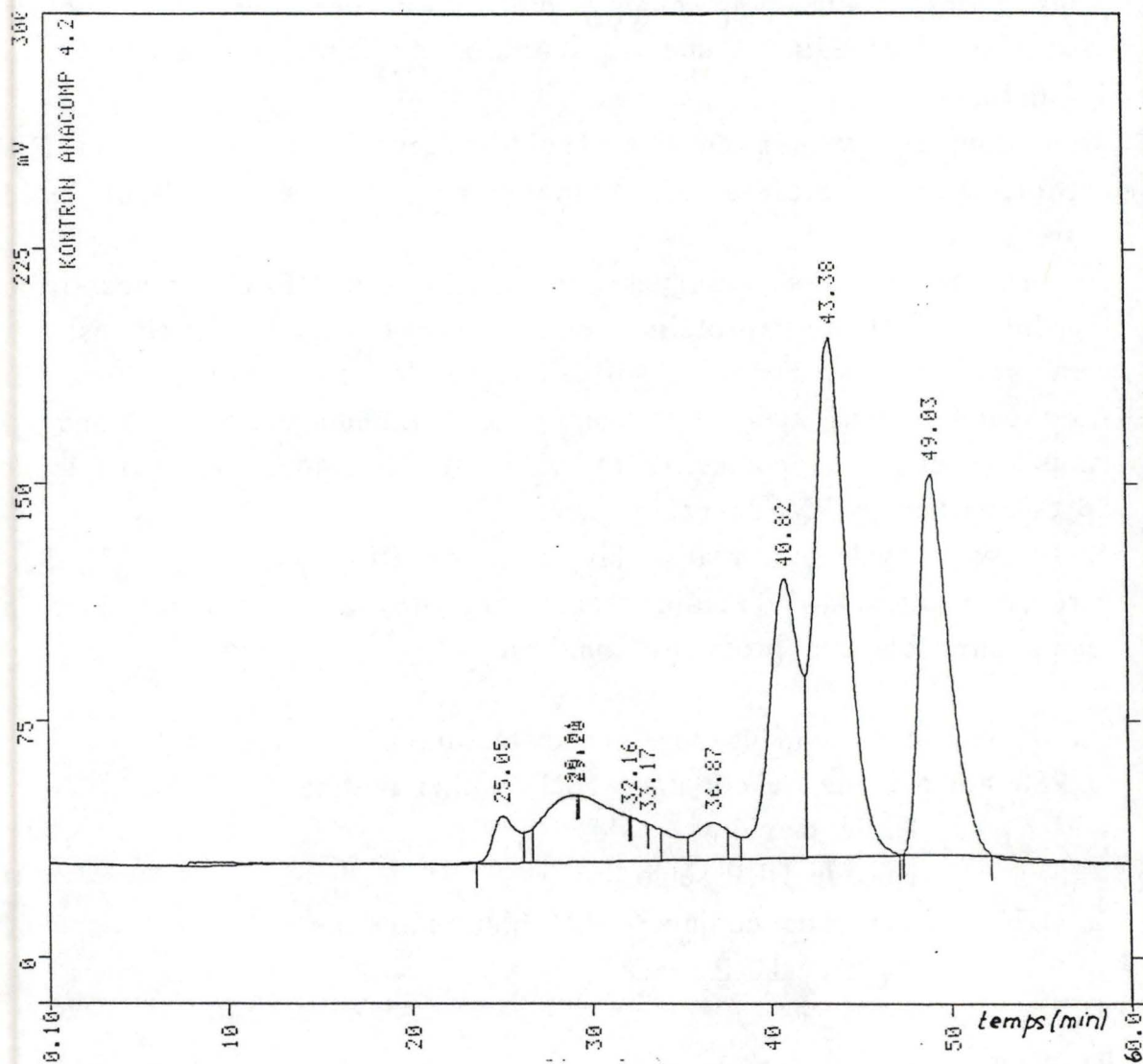


Fig. 46 : Chromatographie de l'Étalonnage de la colonne superose 12

Les pics correspondent respectivement, et de gauche à droite à la thyroglobine (estimation du volume mort de la colonne), à la sérum albumine bovine (SAB) de PM 66 500, à l'ovalbumine de PM 45 000 et au cytochrome C de PM 12 800.

L'appareil est un HPLC Kontron, la colonne est un tamis moléculaire dont les limites d'exclusion sont 1000 à 300000 daltons.

La droite d'étalonnage de cette colonne est reprise à la Fig. 47.

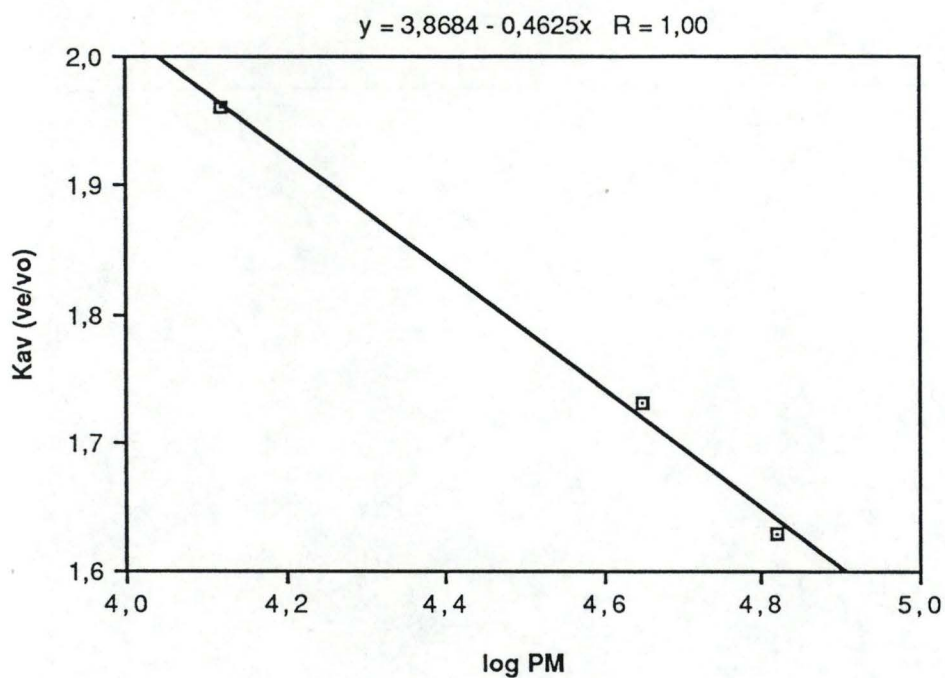


Fig. 47: Droite d'étalonnage de la colonne superose 12 réalisée à partir d'une chromatographie de référence sur cette colonne.

Le Kav est estimé par le rapport ve/vo , où ve est égal au volume d'éluion de la molécule et où " vo " représente le volume mort de cette colonne (estimé par l'éluion de la Thyroglobine).

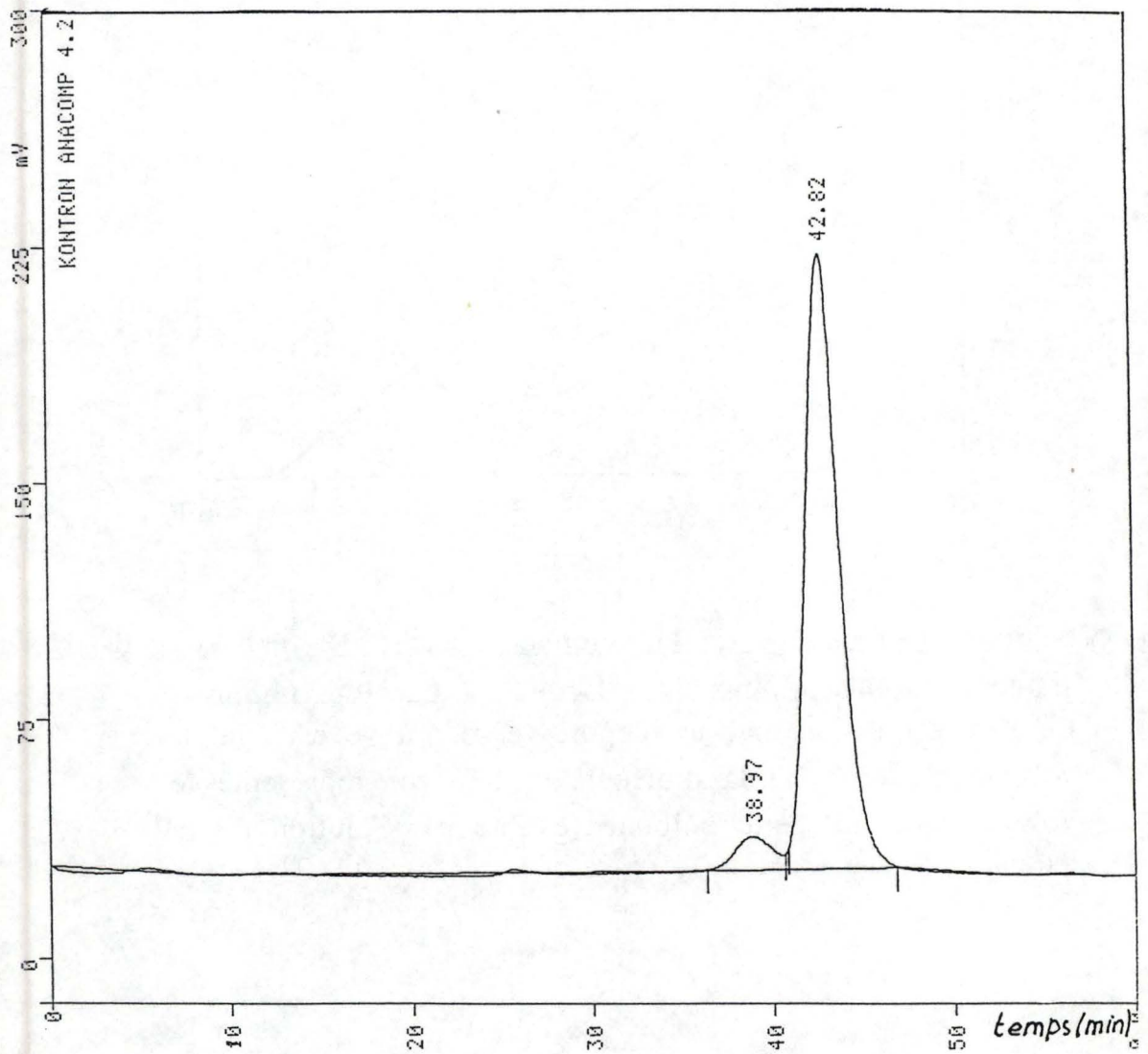


Fig. 48 : Chromatographie de l'Avidine déposée sur le tamis moléculaire superose 12

La concentration en avidine est de 1 mg/ml.

L'absorbance est lue à 280 nm.

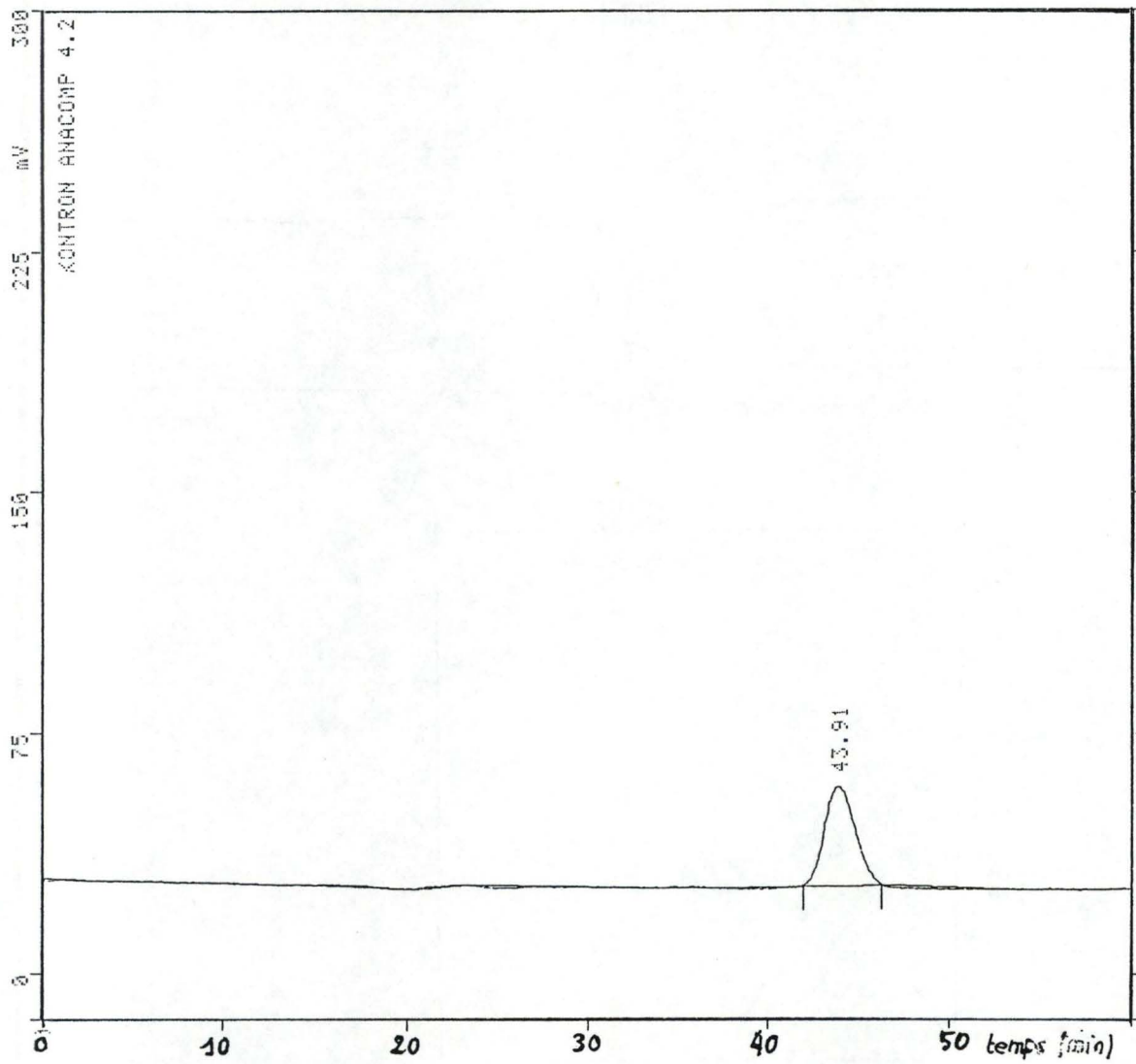


Fig. 49 : Chromatographie de la HRP déposée sur un tamis moléculaire superose 12
L'absorbance est lue à 405 nm.

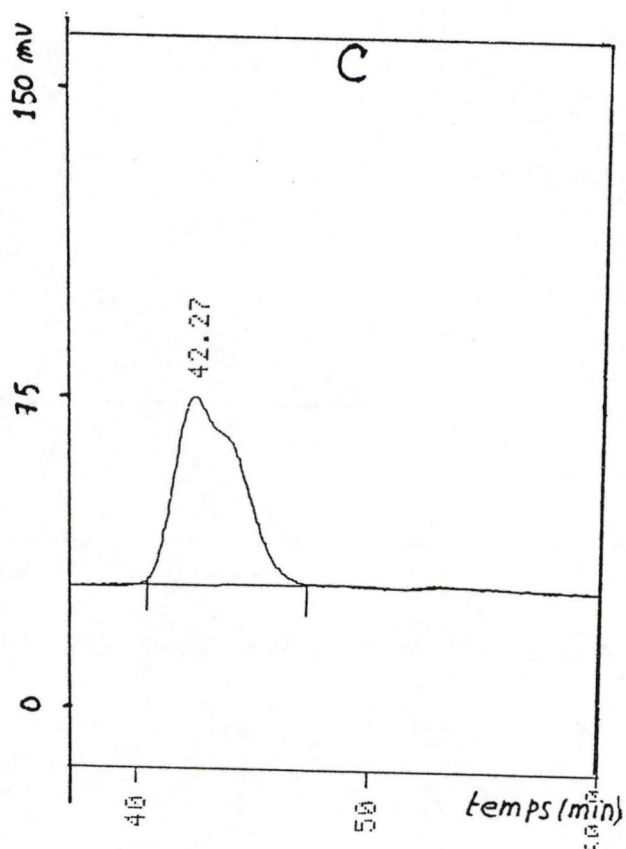
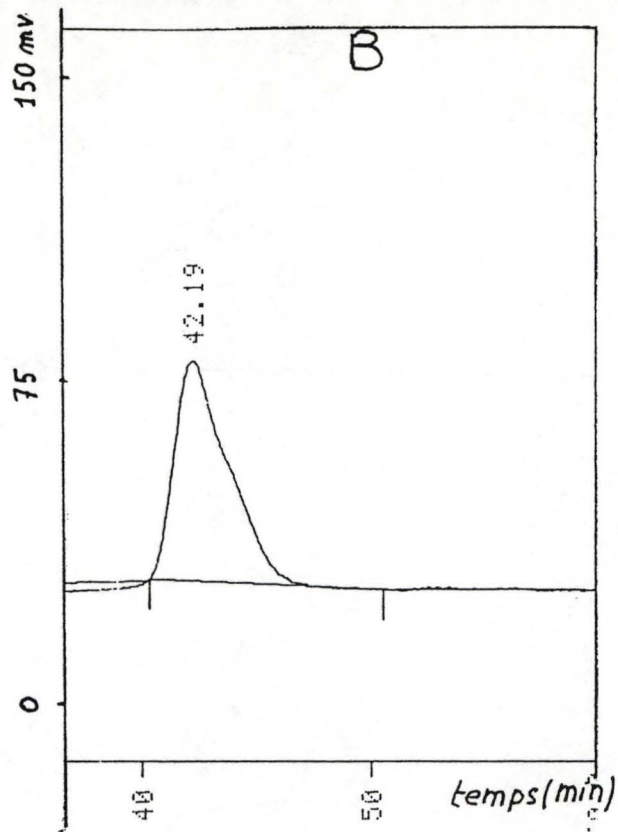
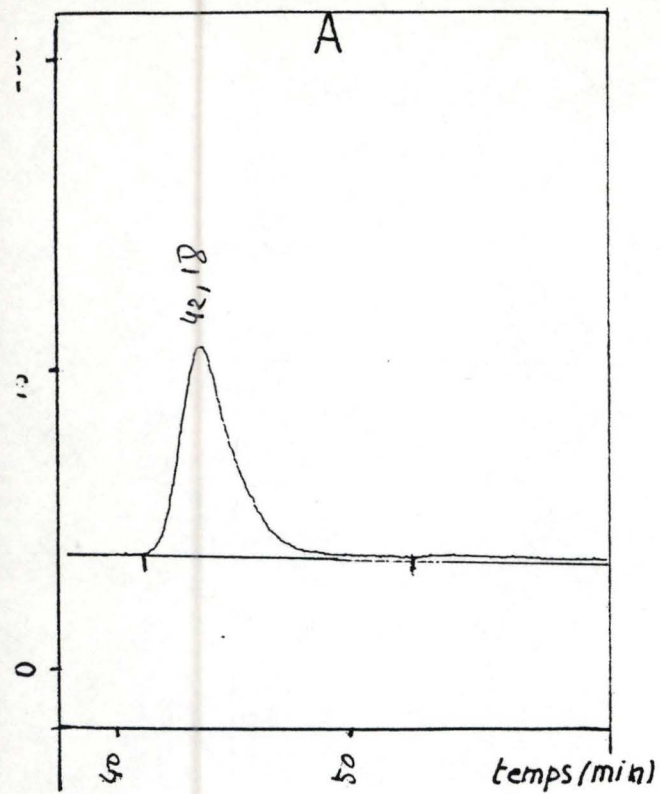


Fig. 50 : Analyse du conjugué sur tamis moléculaire superose 12 en fonction du rapport entre la HRP et la biotine au moment du couplage

Les différents rapports HRP/biotine sont : 1/1 (A)

1/10 (B)

1/100 (C)

L'absorbance est lue à 280 nm.

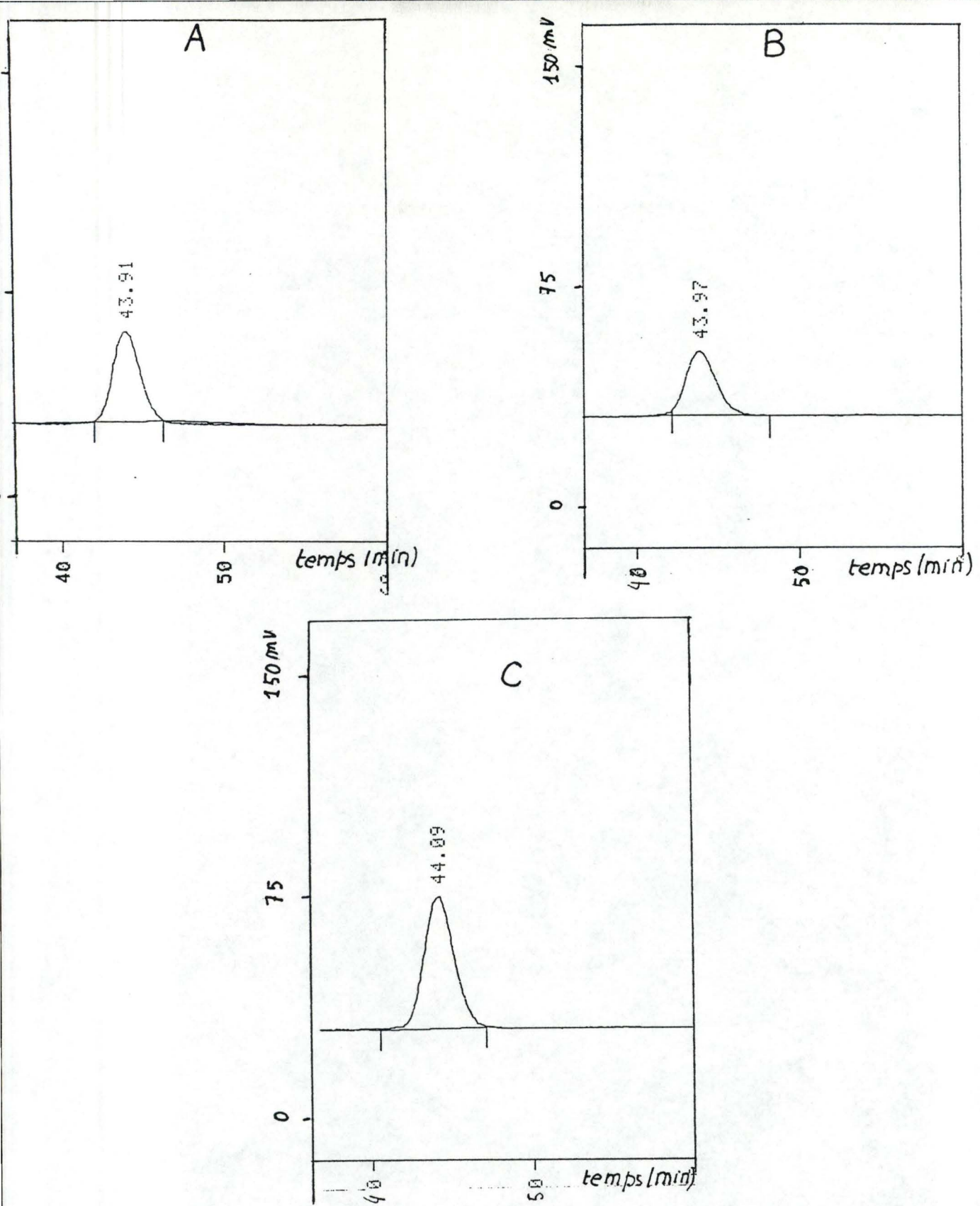


Fig. 51 : Analyse du conjugué sur tamis moléculaire Superose 12 en fonction du rapport entre la HRP et la biotine au moment du couplage

L'absorbance est lue à 405 nm.

Dans cette méthode, il fallait utiliser un excès de biotine important : 75 moles de biotine pour une mole d'IgG pour former les conjugués. Or, les IgG sont des molécules énormes (PM = 150 000) qui possèdent de nombreux groupes amines susceptibles de réagir avec la biotine. Ce n'est pas le cas de la HRP qui ne possède qu'1 ou 2 groupements aminés réactionnels. Les chances de rencontre de ces derniers avec les groupements N-hydroxysuccinimide de la biotine sont sans doute bien faibles.

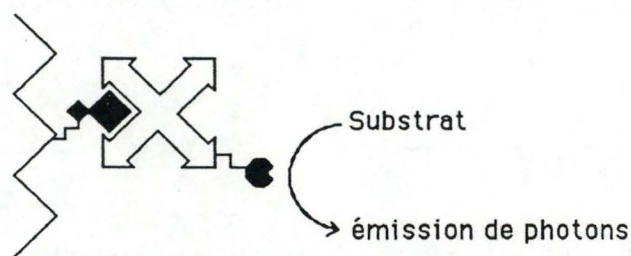
Pour que le couplage ait lieu, il faudrait probablement utiliser un excès de biotine encore plus important.

Or, la biotine est coûteuse et en utiliser d'avantage n'est donc pas une solution intéressante.

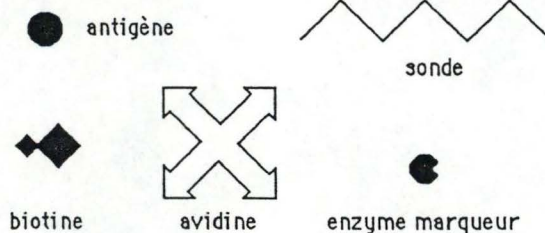
Nous avons choisi de changer la stratégie de couplage : coupler la HRP directement à l'avidine et révéler l'hybridation par fixation du conjugué avidine-HRP sur la sonde biotinylée.

C. Fixation de la HRP couplée à l'avidine sur une sonde biotinylée

Principe



Legende



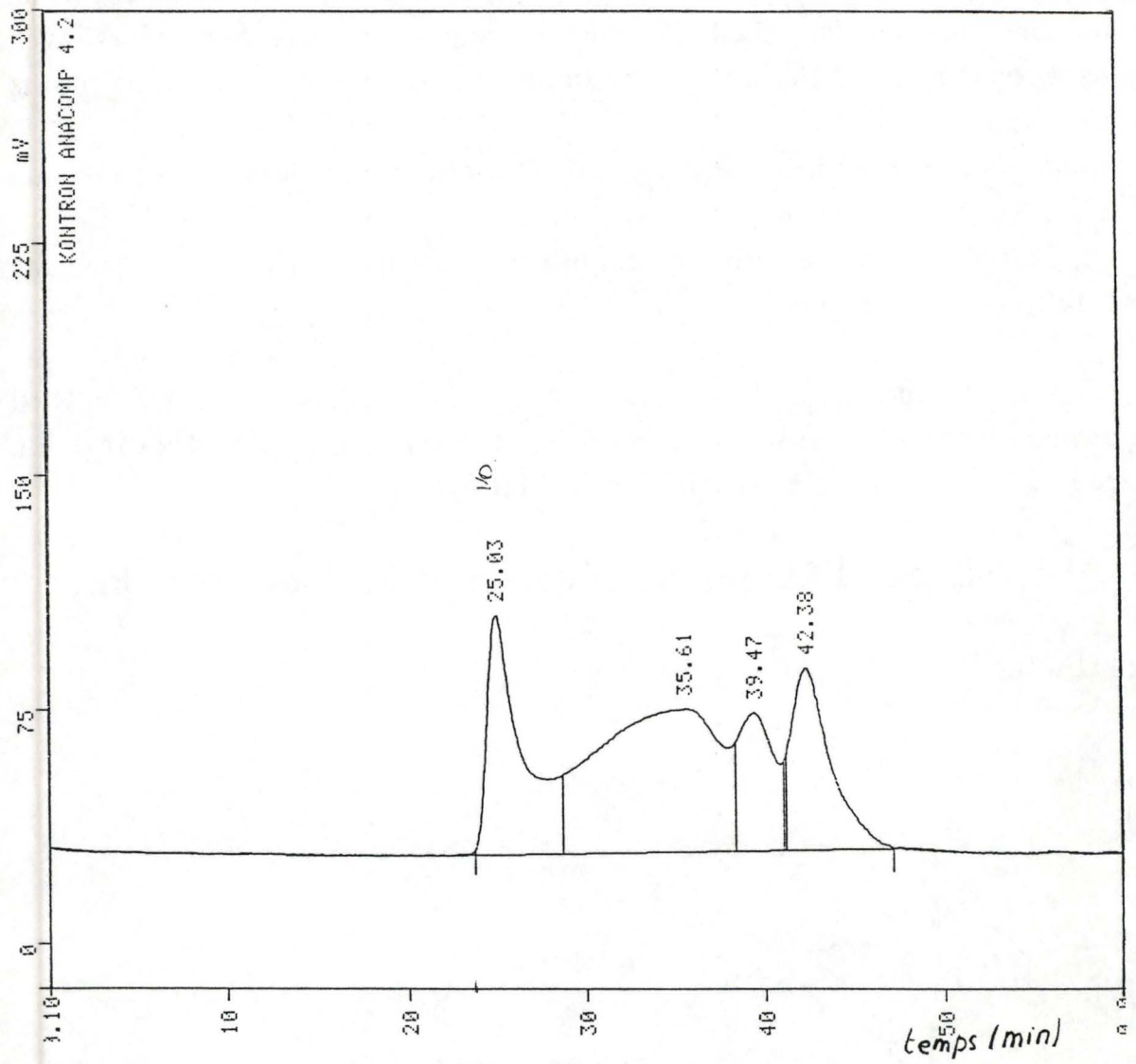


Fig. 52 : Analyse du conjugué avidine-HRP sur tamis moléculaire Superose 12
L'absorbance est lue à 280 nm.

1) couplage HRP-avidine

Nous avons réalisé le couplage de HRP à l'avidine à partir d'un mode opératoire utilisé pour fixer la peroxydase sur des anticorps (Wilson et Nakane, 1968). Cette méthode tire profit des groupements glycosylés sur la peroxydase qui sont activés en aldéhydes par le périodate et qui peuvent alors se condenser avec les amines de l'avidine.

Le produit obtenu est passé sur HPLC avec lecture des absorbances à 280 nm et à 405 nm.,

les tubes correspondant aux différents pics sont recueillis.

Nous avons ensuite mesuré l'activité de la HRP dans chaque tube après couplage.

Résultats :

-Profil des pics : on peut observer 4 pics à 405 nm (fig. 53) et à 280 nm (fig. 52). Nous pouvons déterminer les produits correspondant à chaque tube en se référant à la droite d'étalonnage ainsi qu'au profil d'élution de la HRP et de l'avidine seules.

Il y a eu un léger décalage des pics de la fig. 52 vers les temps plus courts, comme on peut l'observer par la mesure des activités de la peroxydase à la fig. 54.

Le pic de la peroxydase seule se situe à 44 min comme observé à la fig. 53 et 49. Celui de l'avidine est obtenu à 42 min (cfr. fig. 52 et 48).

-Calculs des poids moléculaires correspondant aux produits obtenus.

Le volume mort contient certainement des polymères suivis par la suite de conjugués de tailles diverses.

Le deuxième pic est extrêmement étalé et correspond donc à un mélange de conjugués divers ayant des poids moléculaires variables. En se basant sur la droite d'étalonnage de la colonne Superose, nous pouvons estimer que les conjugués situés entre 29 et 37 min correspondent à des poids moléculaires compris entre 260 000 et 160 000.

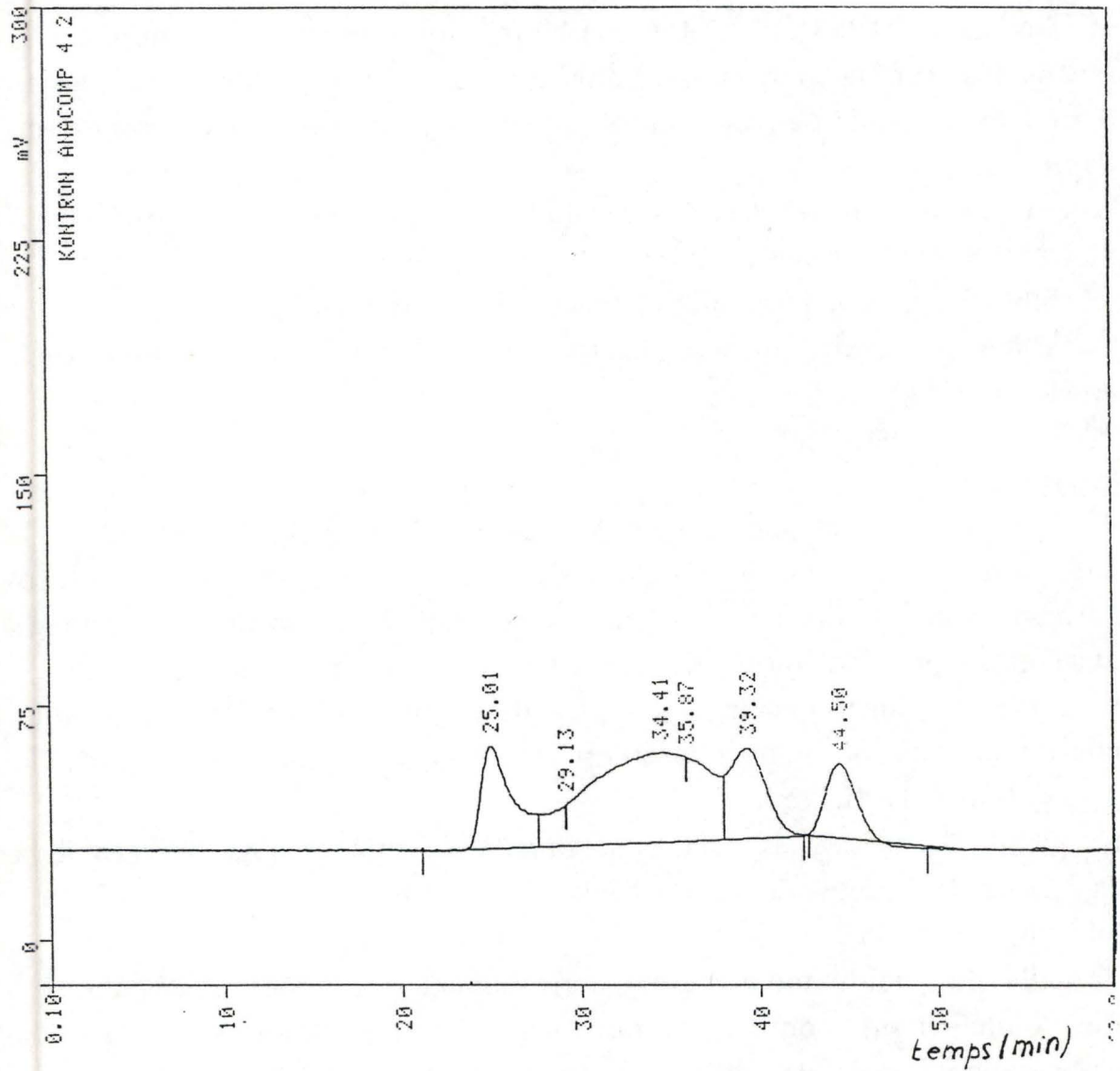


Fig. 53 : Analyse du conjugué avidine-HRP sur tamis moléculaire Superose 12
L'absorbance est lue à 405 nm.

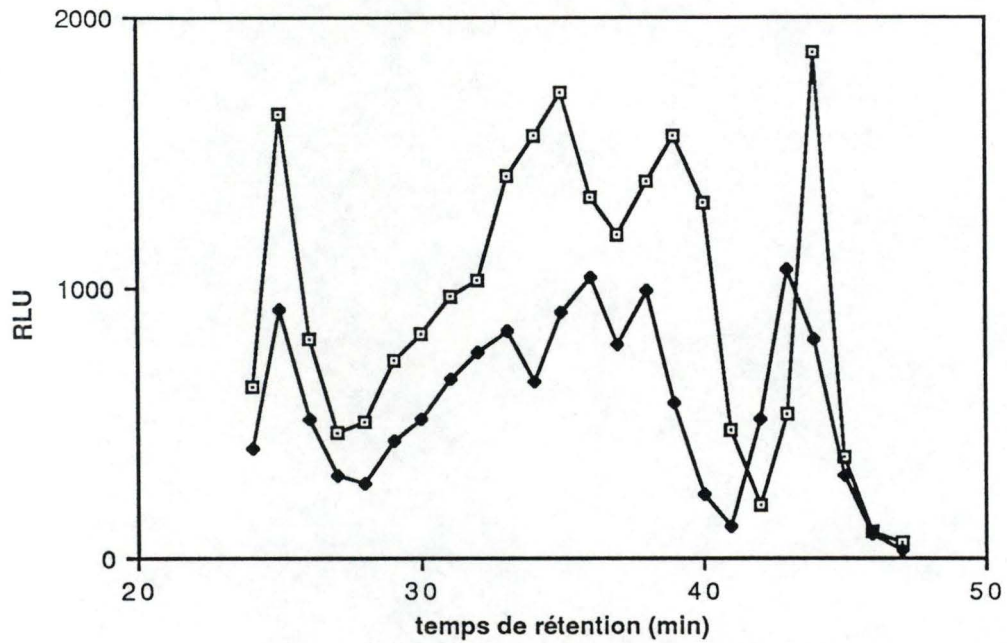


Fig. 54 : Mesure de l'activité de la HRP après couplage à l'avidine et après passage sur HPLC.

Les fractions des fig.53 (□) et 52 (●) sont recueillies toutes les minutes et on mesure l'activité de chaque tube en chémoluminescence (maximum de l'intensité lumineuse en RLU).

Le troisième pic apparaît à un poids moléculaire de 100 000. finalement le dernier pic qui apparaît après un temps d'élution de 42 min (absorbance à 280 nm) correspond à l'avidine (PM 67 000) et celui situé à 44 min (absorbance à 405 nm) à la peroxydase (PM 45 000)

Se basant sur ces considérations, on peut supposer que le pic s'éluant à 39 min c'est à dire correspondant à des protséines de poids moléculaire d'environ 100 000 serait composé d'une avidine fixée à une peroxydase. La fixation de deux avidines conduirait déjà à des poids moléculaires de l'ordre de 160 000 s'éluant dans l'ensemble complexe de poids moléculaires divers (deuxièmes pic d'élution).

-Rendement de couplage

Les conjugués peroxydase avidine représenteraient 17 % ou 13 % selon la mesure à 405 nm ou 280 nm.

Le rendement est plus important quand on mesure l'absorbance à 405 nm, c'est à dire exprimés en fonction de la peroxydase.

Après avoir réalisé le couplage de l'avidine à la HRP nous allons tester l'efficacité du système avidine-biotine en vue de fixer l'avidine couplée à la HRP sur la sonde biotinylée.

2) ELISA

Nous allons à présent tester l'efficacité du système avidine-biotine et la sensibilité du système de détection c'est-à-dire la quantité minimale d'antigène pouvant être détectée par ce système.

- 1) Principe de l'ELISA :-fixer sur la boîte des Ac trappeurs
 - ajouter l'Ag à différentes concentrations
 - ajouter les IgG biotinylés à la concentration optimale
 - ajouter l'avidine marquée à la HRP
 - révéler en spectrophotométrie et en chémoluminescence

Pour réaliser cet ELISA, nous avons besoin d'IgG biotinylés.

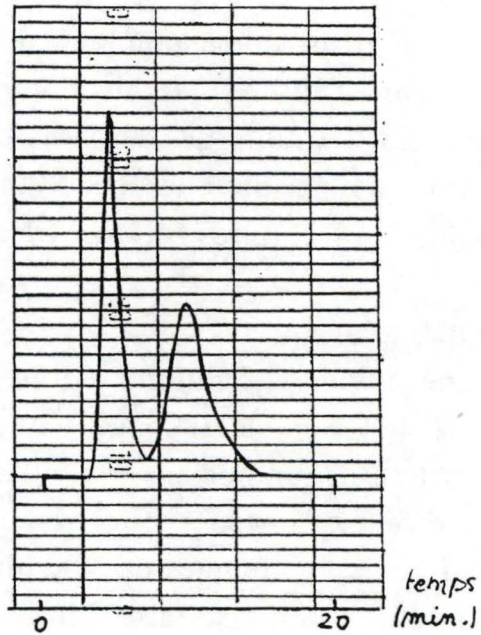


Fig. 55: Purification des IgG biotinylés sur tamis moléculaire G25
en vue l'éliminer la biotine en excès
La longueur d'onde de détection est fixée à 280 nm.

C'est pourquoi nous avons tout d'abord préparé des IgG biotinylés.

2) Couplage IgG-biotine

Le mode opératoire choisi a été mis au point par Strasburger et Kohen (1989).

Résultats :

Après élimination de la biotine en excès par purification sur une colonne (1,2 x 10 cm de Séphadex G25 (fig. 55), nous avons testé l'efficacité du couplage en ajoutant de l'avidine à la préparation obtenue.

Nous avons observé la formation instantanée d'un précipité. Il n'apparaît pas de précipité si on met en présence de l'avidine avec des IgG seuls.

Le précipité est probablement dû à un réseau de polymérisation formé entre l'avidine et les IgG biotinylés.

Il y a bien eu couplage mais il n'a pu être mis en évidence par passage sur HPLC étant donné la forme précipitée. des produits obtenus.

Ayant à présent à notre disposition des IgG biotinylés, nous avons pu ensuite réaliser l'ELISA.

Ne connaissant pas les concentrations optimales en conjugués à utiliser, nous avons d'abord déterminé les titres en avidine-HRP et en IgG biotinylés.

3) Courbes de concentration en conjugués

Principe : -fixer sur la boîte les Ac trappeurs

-ajouter les IgG biotinylé à différentes concentrations

-ajouter l'avidine marquée à la HRP à différentes concentrations

-révéler en spectrophotométrie et en chémoluminescence

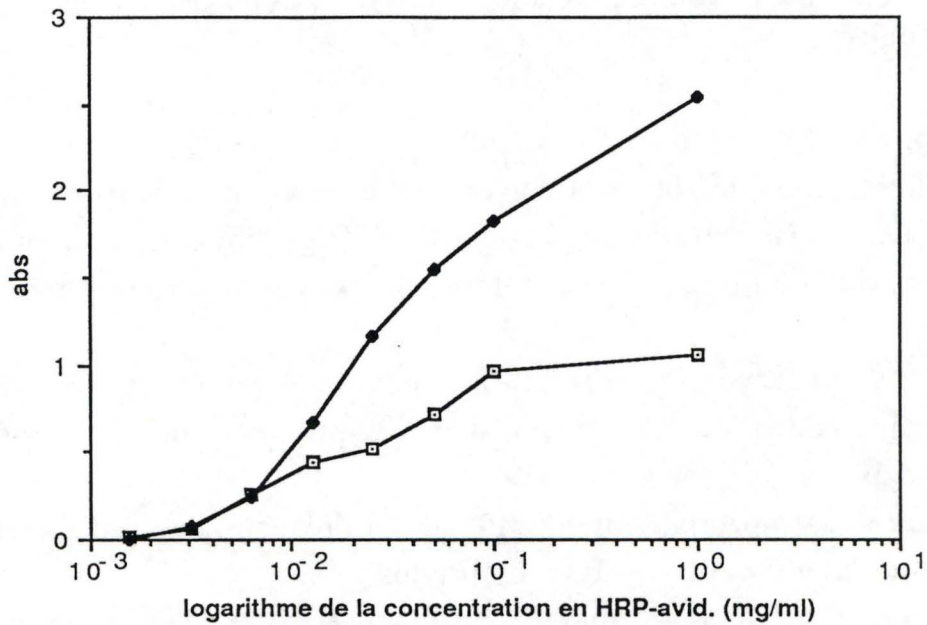


Fig. 56 : Courbe de titration en conjugué avidine-HRP dans un test de type ELISA (-●-)

avec une concentration en IgG biotinylés de 500 µg/ml.
L'activité de la HRP est mesurée en spectrophotométrie.
L'absorbance est lue à 405 nm.

Les Ag trappeurs sont des IgG de souris pour les blancs (-□-).

Résultats :

-en spectrophotométrie : nous avons lu l'absorbance en fonction de la concentration en avidine-HRP pour 3 concentrations en IgG-biotine : 500 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ et 5 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 56-57-58).

Pour la concentration en IgG-biotine de 500 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 56), nous observons une augmentation de l'absorbance au fur et à mesure que la concentration en avidine-HRP augmente mais les blancs sont élevés.

Dans ce cas, les IgG-biotine sont présents en très grande quantité et il y a saturation de l'antigène mais avec une adsorption non spécifique relativement importante (blancs élevés).

Pour la concentration en IgG-biotine de 50 $\mu\text{g/ml}$, (fig. 57) nous observons une augmentation de l'absorbance entre 5. 10^{-3} et 10^{-1} mg/ml de conjugués avidine-HRP et les blancs restent faibles. Dans cette zone de concentration, les IgG-biotine sont en excès et il y a saturation de l'Ag. Cependant la quantité l'IgG-biotine étant moindre que précédemment, la fixation non spécifique reste raisonnable par rapport aux tests.

Pour la concentration en IgG-biotine de 5 $\mu\text{g/ml}$, (fig. 58), nous observons une augmentation de l'absorbance entre 5. 10^{-3} et $2. 10^{-2}$ mg/ml de conjugués avidine-HRP mais cette augmentation se termine par un plateau et les blancs sont encore plus bas.

Dans cette zone de plateau, les IgG-biotine ne sont plus en excès, ils deviennent le facteur limitant la réaction car le fait d'ajouter de plus en plus d'avidine-HRP ne change rien. Dans ces conditions, une concentration de 60 mg/ml d'avidine-HRP est largement suffisante pour saturer les sites biotinylés des IgG.

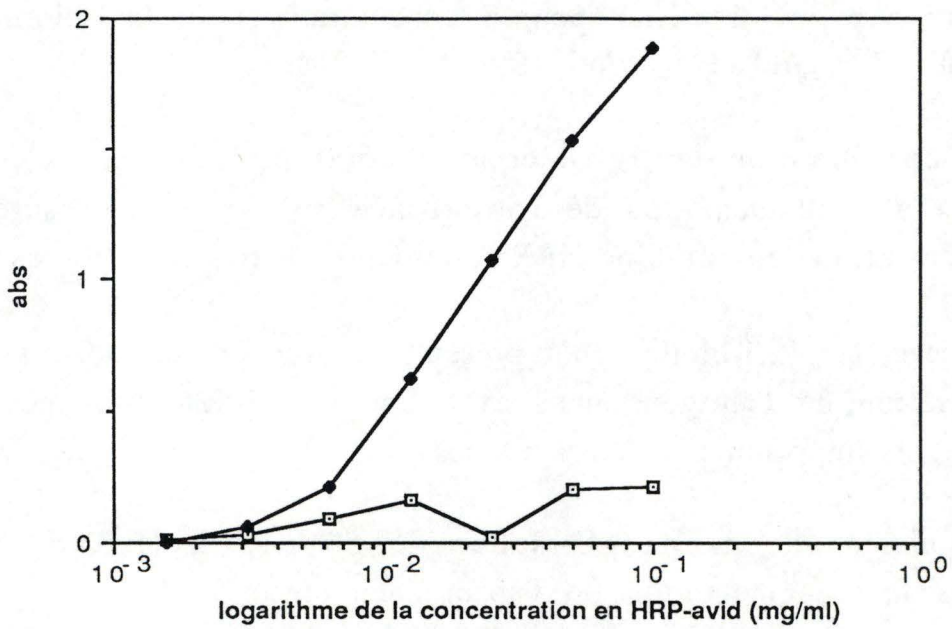


Fig. 57 : Courbe de titration en conjugué avidine-HRP (-●-)
 avec une concentration en IgG biotinylés de 50 μ g/ml dans un
 test de type ELISA.
 Les Ag trappeurs sont des IgG de souris pour les blancs
 (-□-).

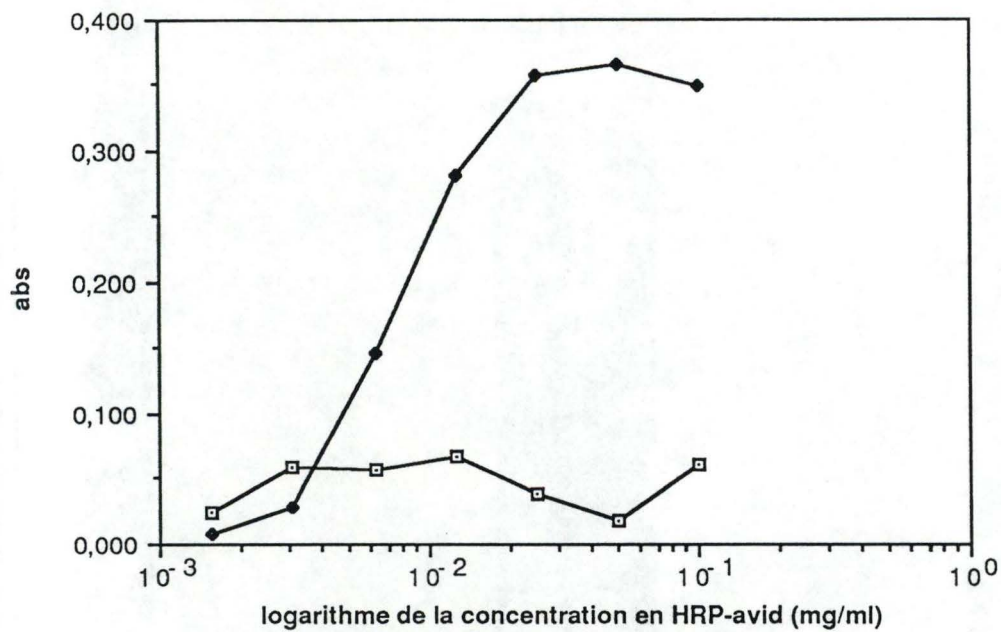


Fig. 58 : Courbe de titration en conjugué avidine-HRP (—●—)
 avec une concentration en conjugué IgG biotinylés de 5 μ g/ml
 dans un test de type ELISA.
 Les Ag trappeurs sont des IgG de souris pour les blancs
 (—□—).

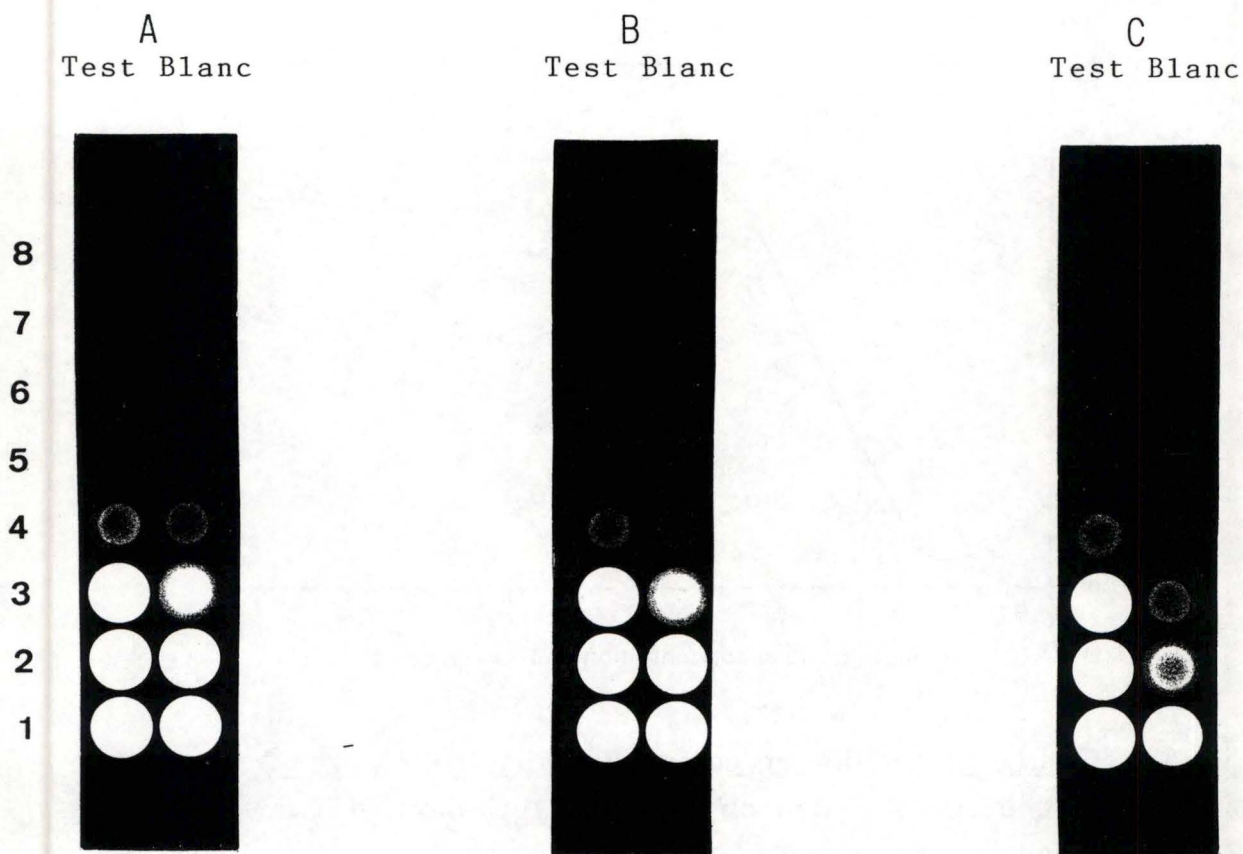


Fig. 59 : Détermination du titre des conjugués en luminescence

La mesure de l'activité est réalisée au moyen d'une photo Polaroid 20 000 ASA.

Les concentrations en avidine-HRP sont :

- 600 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 1
- 60 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 2
- 30 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 3
- 15 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 4
- 7,5 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 5
- 3,7 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 6
- 1,9 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 7
- 0,6 $\mu\text{g/ml}$ dans le puits 8

Les concentrations en IgG biotinylés sont :

- 500 $\mu\text{g/ml}$ en A
- 50 $\mu\text{g/ml}$ en B
- 5 $\mu\text{g/ml}$ en C.

-en chémoluminescence (fig. 59):

La limite de détection apparait comme étant de 15 $\mu\text{g/ml}$ d'avidine-HRP dans les trois expériences réalisées.

Comme pour la spectrophotométrie, la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$ en IgG biotinylés donne une fixation non spécifique très élevée (A). Elle est encore forte à 50 $\mu\text{g/ml}$ (B) et ce n'est qu'à la plus faible concentration (5 $\mu\text{g/ml}$) que la différence entre le test et le blanc devient importante (C). On remarque que la fin de la détection apparaît pour une concentration de 15 $\mu\text{g/ml}$ ce qui est un plus élevé que la détection en spectrophotométrie (cfr. fig. 58).

4) ELISA proprement dit

Nous avons réalisé le titre en antigène (IgG de lapin) en utilisant des IgG de mouton anti-lapin biotinylés puis le conjugué avidine-HRP. La peroxydase a été détectée en spectrophotométrie (lecteur de plaque) et en chémoluminescence.

Résultats :

-en spectrophotométrie (fig. 60):

Nous observons une augmentation régulière de l'absorbance au fur et à mesure que la concentration en Ag augmente depuis 10^{-5} mg/ml jusqu'à 0,1 mg/ml.

Le seuil de détection est de 25 ng d'Ag/ml soit $0,17 \cdot 10^{-9}$ mole/l dans la solution d'antigène soit $1,7 \cdot 10^{-14}$ mole/test (50 μl)

-en chémoluminescence (fig. 61):

Nous observons une augmentation de l'intensité du signal lumineux quand la concentration en Ag augmente.

Le seuil de détection en Ag est le même qu'en spectrophotométrie c'est-à-dire autour de 25 ng/ml ou 10^{-14} mol/test (100 μl).

Cependant on sait que la sensibilité de l'appareil photo est plus faible que celle obtenue avec le bioluminomètre.

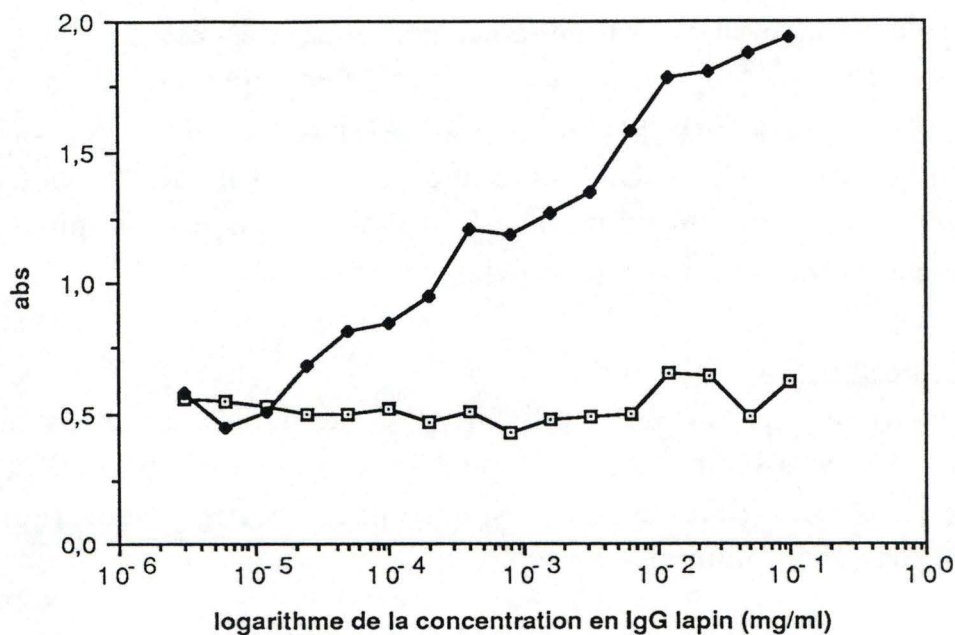


Fig. 60 : Courbe de titration en antigène (IgG de lapin) (●)
 La concentration en anti-IgG biotinylés est de 50 $\mu\text{g/ml}$
 (concentration optimale).
 La concentration en avidine-HRP est de 60 $\mu\text{g/ml}$
 (concentration optimale).
 L'activité de la HRP est mesurée en spectrophotométrie avec
 lecture de l'absorbance à 405 nm.
 Les Ac trappeurs sont des IgG de souris pour les blancs
 (□).

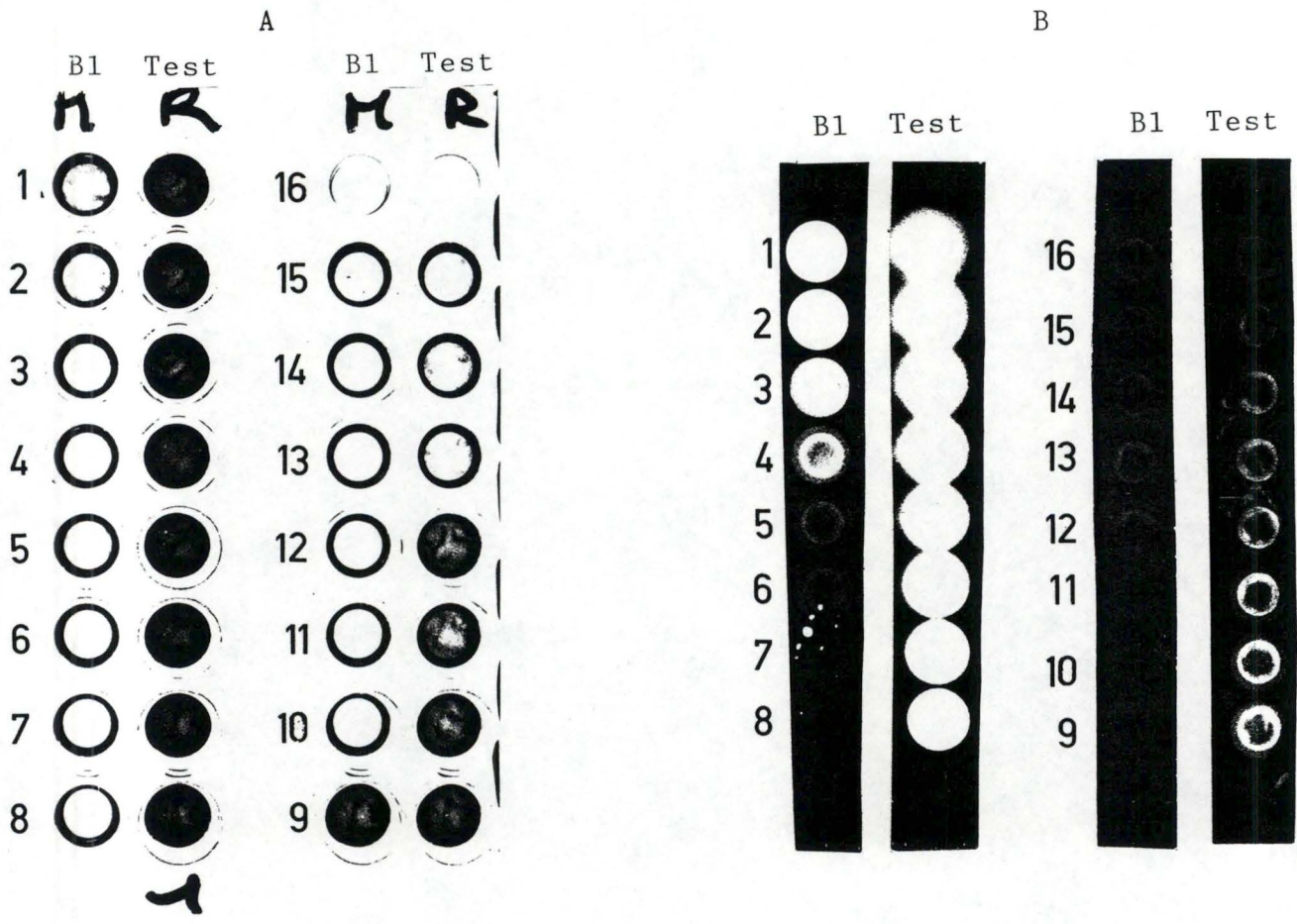


Fig. 61: Représentation photographique du titre de l'antigène (IgG de lapin) en spectrophotométrie (A) et en luminescence (B)

La concentration en antigène est de :

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| 100 ug/ml au puits 1 | 0,38 µg/ml au puits 9 |
| 50 µg/ml au puits 2 | 0,19 µg/ml au puits 10 |
| 25 µg/ml au puits 3 | 0,097 µg/ml au puits 11 |
| 12,5 µg/ml au puits 4 | 0,049 µg/ml au puits 12 |
| 6,25 µg/ml au puits 5 | 0,024 µg/ml au puits 13 |
| 3,12 µg/ml au puits 6 | 0,012 µg/ml au puits 14 |
| 1,56 µg/ml au puits 7 | 0,006 µg/ml au puits 15 |
| 0,78 µg/ml au puits 8 | 0,003 µg/ml au puits 16. |

Cet ELISA nous a permis de tester l'efficacité du système avidine-biotine.ainsi que de déterminer le seuil de sensibilité en antigène.

Aux vues des résultats, on peut dire que le système avidine-biotine fonctionne bien et que l'on peut descendre relativement bas en sensibilité.

Nous pouvons donc à présent transposer ce système à la révélation d'une sonde biotinylée.

Il nous fallait dès lors disposer d'une sonde biotinylée.

III.Marquage de la sonde par biotinylation

Le but de ce travail n'étant pas de fabriquer une sonde biotinylée mais plutôt d'utiliser cet outil dans notre système de détection, nous avons fait fabriquer une sonde biotinylée (oligonucléotide) par une firme (EUROGENTEC).

Nous avons choisi une sonde DNA simple brin de 30 paires de bases (pb) et complémentaire d'une séquence du gène histone H4.

Justification de ce choix :

-simple brin : dans le but de faciliter l'hybridation

-courte : pour des raisons de coût

-complémentaire du gène H4 : car c'est un gène multicopies c'est-à-dire qui s'exprime bien et donne beaucoup d'ARNm.

La séquence de la sonde est : GGG ACA ATT GAG AAC GCT TCC CGC CGGCGC.

Nous avons choisi une séquence qui comporte un grand nombre de bases C et G car le lien entre ces paires de bases est plus fort qu'entre les bases T et A.

Donc, plus la sonde comporte de bases C et G, meilleure sera la liaison entre la sonde et la séquence qui lui est complémentaire.

Le système de détection étant au point, nous pouvons à présent réaliser l'hybridation

Le but final de ce travail est de réaliser l'hybridation in situ.

Nous allons cependant dans un premier temps réaliser l'hybridation de la sonde avec l'ARNm qui lui est complémentaire afin de faciliter la mise au point.

IV Hybridation de la sonde biotinylée avec l'ARNm complémentaire

A. Principe

- isolation de l'ARN à partir de fibroblastes humains
- Northern blot : -électrophorèse, visant à séparer les ARN isolés selon leur leur PM. cette électrophorèse est réalisée dans des conditions dénaturantes car l'ARN possède tout comme l'ADN une structure secondaire (épingles à cheveux), qui doit être déployée afin de faciliter la séparation des brins
- transfert des brins sur un filtre de nitrocellulose (phase solide) car il est plus aisé de travailler avec un support solide plutôt que de réaliser l'hybridation sur le gel lui même
- Hybridation de la sonde biotinylée
- Révélation : -incubation avec de l'avidine marquée à la HRP
- révélation de la HRP à la DAB (chromogène) et en chémoluminescence

B. Standardisation du système de détection

Nous allons d'abord examiner le signal donné par différentes concentrations en avidine-HRP appliquées directement sur une feuille de nitrocellulose à raison de 1 μ l. La peroxydase a ensuite été révélée de trois façons :

- au moyen de la DAB (diamino benzidine), il apparait un précipité brun à l'endroit où la HRP a été déposée.

- en chémoluminescence dans des tubes. Nous avons découpé la nitrocellulose à l'endroit du dépôt de l'avidine-HRP et nous avons placé chaque morceau au fond d'un tube. La lumière produite est ensuite mesurée par addition des substrats dans les tubes.

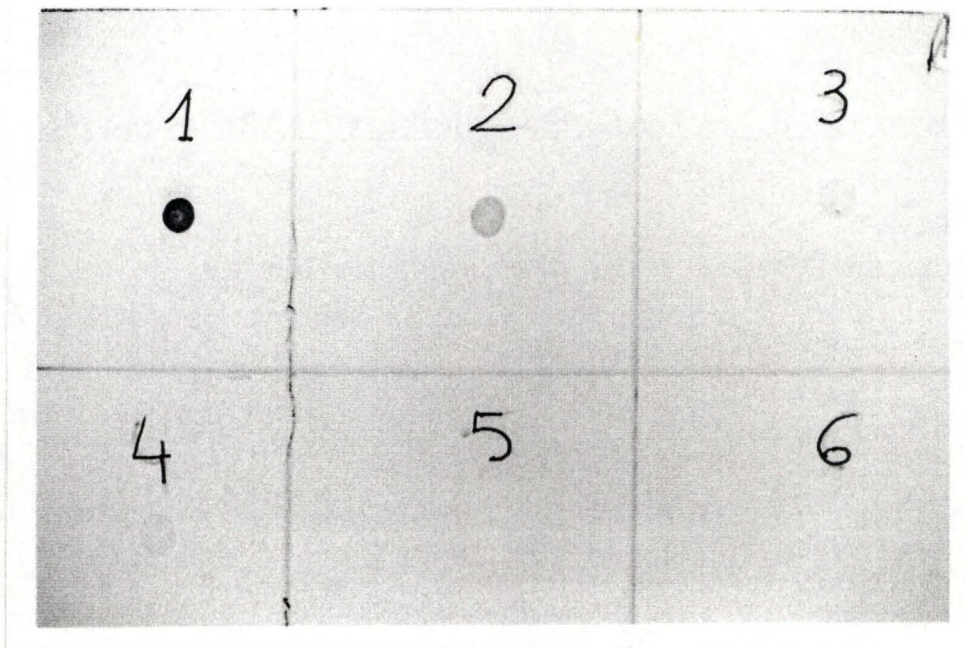


Fig. 62 : Coloration obtenue par la révélation de la HRP à la DAB du conjugué avidine-HRP déposé sur un filtre de nitrocellulose

La concentration en conjugué est : -600 $\mu\text{l/ml}$ en 1

-60 $\mu\text{g/ml}$ en 2

-12 $\mu\text{g/ml}$ en 3

-6 $\mu\text{g/ml}$ en 4

-1,2 $\mu\text{g/ml}$ en 5

-600 ng/ml en 6

On a déposé 1 μl de ces solutions sur le filtre

-en chémoluminescence, par prise d'une photo.

La nitrocellulose imprégnée d'avidine-HRP est déposée dans une petite boîte adaptable sur l'appareil photo. La réaction démarre par addition des substrats dans la boîte. Le temps d'exposition est de 10 min.

Résultats :

-avec la DAB, il faut au moins utiliser une concentration en avidine-HRP d'au moins 60 $\mu\text{g/ml}$ pour avoir un signal valable.(fig. 62)

-en chémoluminescence dans des tubes : il faut aussi utiliser une concentration minimale de 60 $\mu\text{g/ml}$ pour obtenir un signal lumineux satisfaisant (fig.63).

La sensibilité aurait dû être meilleure en chémoluminescence, ce qui n'est visiblement pas le cas.

Il est probable que la nitrocellulose soit responsable de l'absorption partielle de la lumière émise.

-en chémoluminescence par prise d'une photo (fig. 64): il faut utiliser une concentration très élevée d'avidine-HRP pour pouvoir détecter l'enzyme (600 ng/ml), et ceci se comprend puisque l'appareil photo est moins sensible que le bioluminomètre.

Nous avons choisi d'utiliser une concentration en avidine-HRP de 60 $\mu\text{g/ml}$ pour révéler la sonde puisque 1 μl de cette solution est capable de nous donner un signal satisfaisant.

C. Contrôle de l'efficacité de la sonde biotinylée

Nous avons déposé 1 ml de sonde sur une feuille de nitrocellulose à 3 concentrations : 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ et 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Elle est ensuite fixée de façon permanente dans le filtre par cuisson de 2 heures à 80°C. Le filtre est ensuite incubé avec de l'avidine marquée à la HRP, puis on révèle l'enzyme à la DAB et en chémoluminescence (tubes).

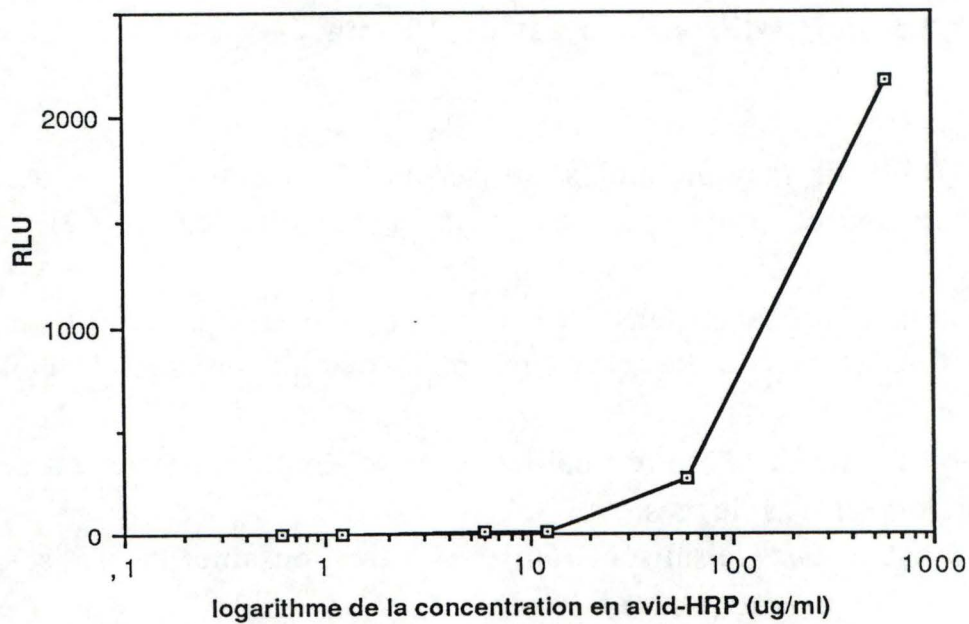


Fig. 63: Courbe de concentration en conjugué avidine-HRP déposé sur un filtre de nitrocellulose

On a déposé 1 μ l de ces solutions sur le filtre. La concentration en PPP est de 100 μ g/ml.

La mesure de l'activité est réalisée en luminescence.

Le signal est intégré sur une minute et est exprimé en RLU

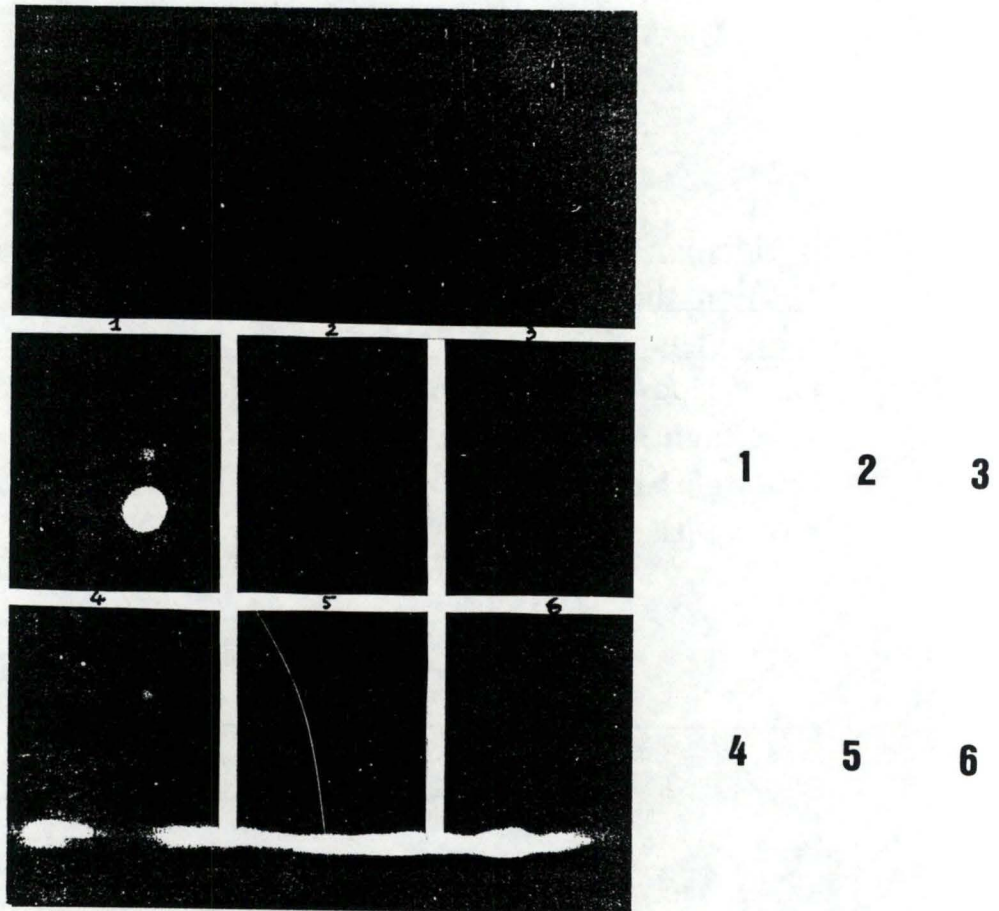


Fig. 64 : représentation photographique de la révélation en chémoluminescence du conjugué avidine-HRP déposé sur un filtre de nitrocellulose

La concentration en conjugué est -600 $\mu\text{g/ml}$ en 1
-60 $\mu\text{g/ml}$ en 2
-12 $\mu\text{g/ml}$ en 3
-6 $\mu\text{g/ml}$ en 4
-1,2 $\mu\text{g/ml}$ en 5
-600 ng/ml en 6

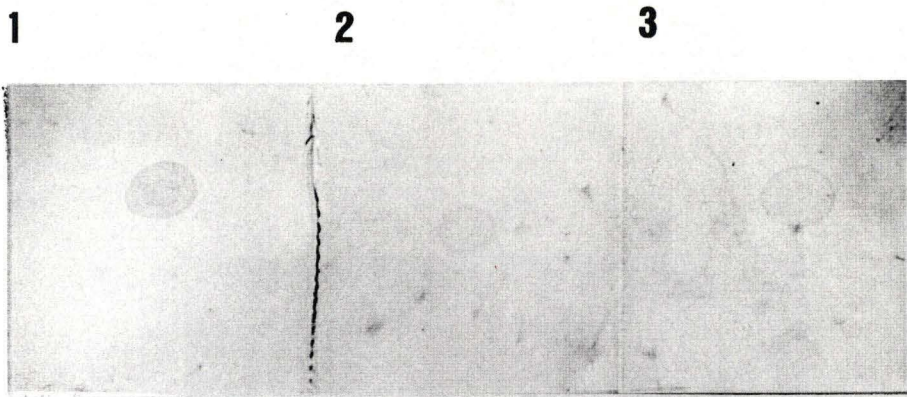


Fig. 65 : Coloration obtenue par la révélation de la HRP à la DAB après fixation du conjugué avidine-HRP sur une sonde nucléique biotinylée déposée sur un filtre de nitrocellulose

On a déposé 1 μ l de sonde aux concentrations suivantes :

- 100 ng/ μ l en 1
- 20 ng/ μ l en 2
- 10 ng/ μ l en 3

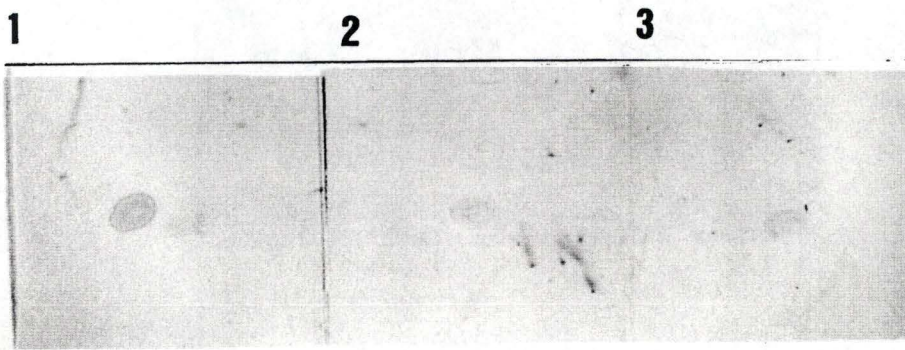


Fig. 66 : Coloration obtenue par la révélation de la HRP à la DAB après fixation du conjugué avidine-HRP sur une sonde immunologique (IgG biotinylés) déposée sur un filtre de nitrocellulose.

On a déposé 1 μ l de sonde aux concentrations suivantes :

- 1 μ g/ μ l en 1
- 100 ng/ μ l en 2
- 10 ng/ μ l en 3

contrôles :

-Nous avons réalisé un Western blot en fixant 1 μ l d'IgG biotinylés à différentes concentrations sur la nitrocellulose par le même procédé que pour la sonde nucléique afin de déterminer si la fixation de l'avidine sur la biotine de la sonde est bien spécifique.

-Nous avons fixé 1 μ l de sonde non biotinylée sur la nitrocellulose comme contrôle.

Résultats :-révélation à la DAB

-sonde nucléique biotinylée :le précipité obtenu nous indique que la sonde fonctionne bien (fig. 65). Le signal est d'autant meilleur que la concentration de la sonde est élevée. Nous allons donc utiliser la sonde à la concentration la plus élevée (100 ng/ μ l) lors des manipulations ultérieures

Contrôles :

-Les IgG biotinylés donnent un signal de même intensité que celui obtenu avec la sonde nucléique (fig. 66). La concentration en avidine-HRP utilisée pour la révélation est identique à celle qui avait été optimisée par l'ELISA.

-La sonde non biotinylée n'est pas révélée (contrôle négatif à la fig. 67).

-en chémoluminescence :

-sonde nucléique biotinylée (fig. 68): les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus en révélant à la DAB.

-Les IgG biotinylés (fig. 69) les tests ont une valeur positive déjà aux plus faibles concentrations en sonde utilisée ici (10 ng/ μ l).

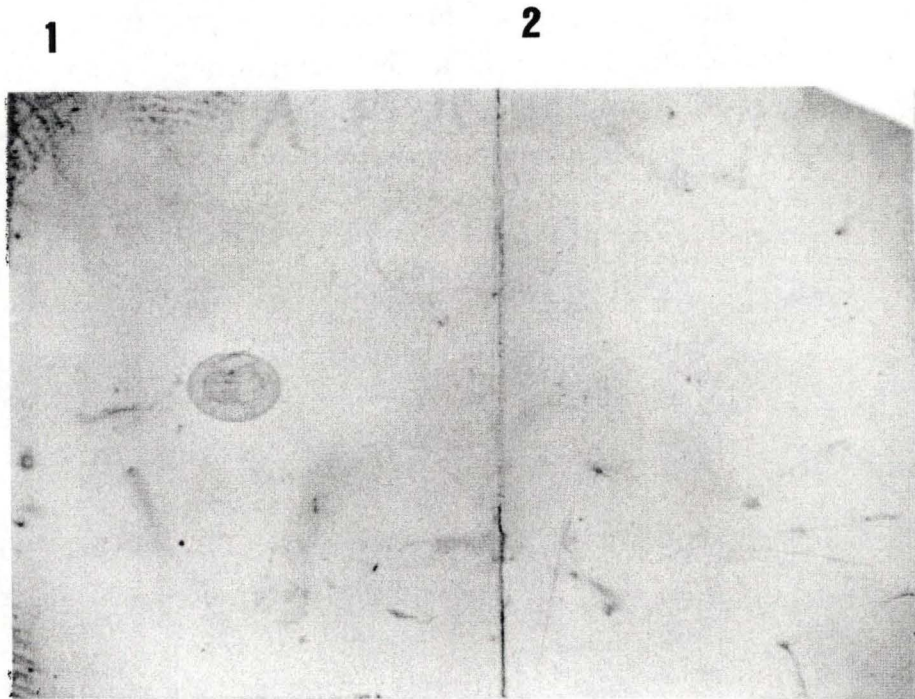


Fig. 67 : Coloration obtenue par la révélation de la HRP à la DAB après fixation du conjugué avidine-HRP sur une sonde biotinylée (1) et non biotinylée (2) déposées sur nitrocellulose (on a déposé 1 μ l de sonde).

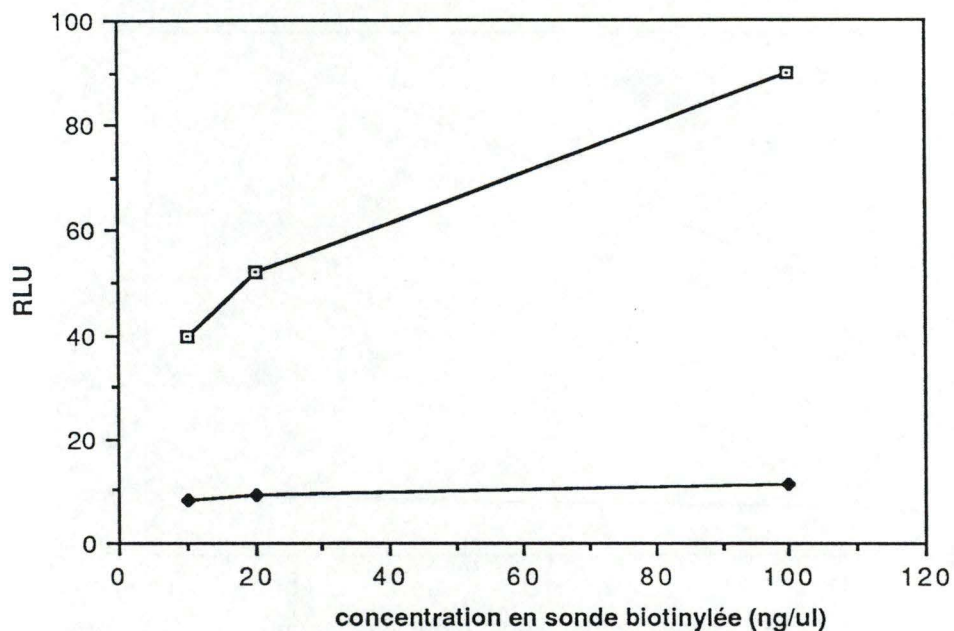


Fig. 68 : Courbe d'activité en HRP après fixation du conjugué avidine -HRP sur une sonde à acide nucléique biotinyllée
 On a déposé 1 μ l de sonde à différentes concentrations (\square).
 Les blancs sont réalisés avec une sonde non biotinyllée (\blacklozenge).
 L'activité de la HRP est mesurée en luminescence. Le signal est intégré sur une minute et est exprimé en RLU.

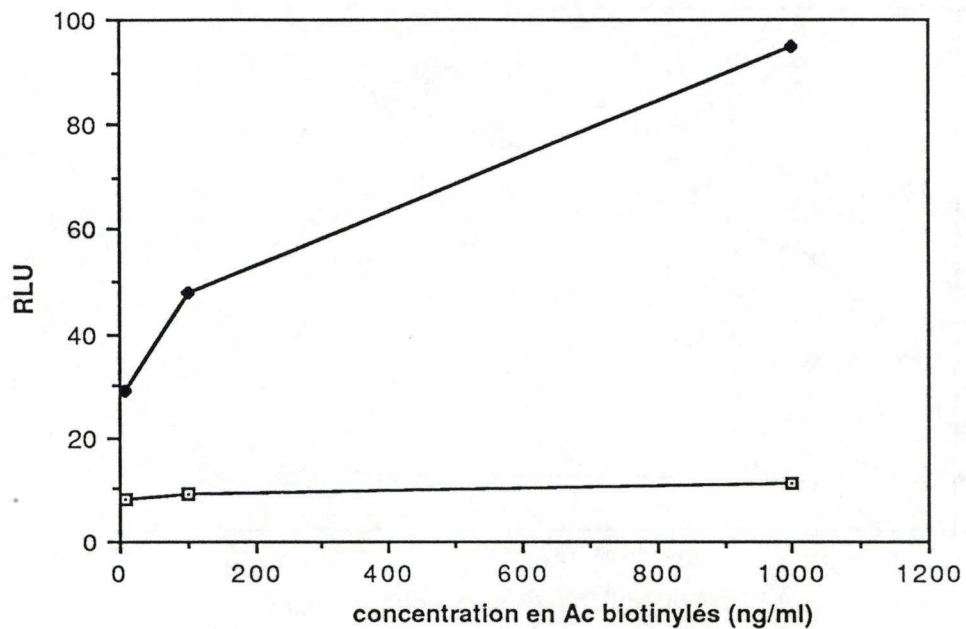


Fig. 69 : Courbe d'activité en HRP après fixation du conjugué avidine-
HRP sur une sonde immunologique (IgG biotinylés)
On a déposé 1 μ l de sonde à différentes concentrations
(●)
Les blancs sont réalisés avec des IgG non biotinylés (□).

L'adsorption non spécifique est généralement importante. Elle est due en grande partie à l'avidine qui se fixe de façon non spécifique par ses résidus glycosylés. On aurait pu utiliser de la streptavidine à la place de l'avidine car cette protéine possède les mêmes propriétés de liaison à la biotine sans présenter l'inconvénient de se fixer non spécifiquement étant donné qu'elle ne possède pas de résidus glycosylés.

Nous n'avons cependant pas utilisé la streptavidine dans ce travail du fait de son coût élevé.

D. Dot blot

Ce procédé est une hybridation rapide de la sonde sur un échantillon d'ARN, sans passer par l'électrophorèse et le transfert. Il permet de tester si les conditions d'hybridation sont adéquates (T° , force ionique principalement).

L'ARN total est fixé sur de la nitrocellulose à deux concentrations : 10 μ l d'ARN isolé à partir de 10^6 cellules et 20 μ l à partir de $2 \cdot 10^6$ cellules). Le contrôle est réalisé par dépôt de 10 μ l d'une solution de saline (SSC 10x). Nous avons ensuite réalisé l'hybridation et la révélation.

Résultats (fig. 70):

Le précipité obtenu nous indique que l'hybridation a eu lieu. Les conditions d'hybridation sont donc adéquates. Le signal est d'autant meilleur que la quantité d'ARN utilisée est élevée. Nous allons donc utiliser par la suite de l'ARN isolé à partir de $2 \cdot 10^6$ cellules.

Le contrôle est négatif.

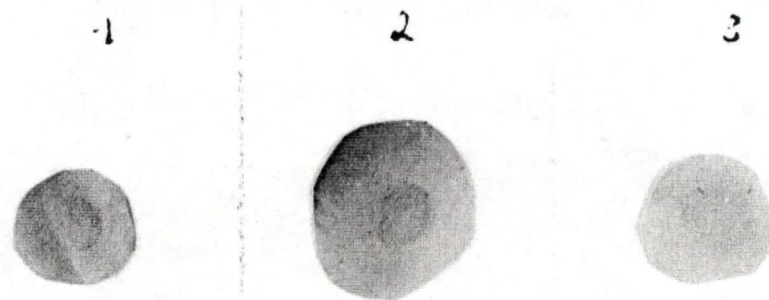


Fig. 70: Dot blot

Coloration obtenue par la révélation de la HRP à la DAB après fixation du conjugué avidine-HRP sur une sonde biotinylée hybridée à de l'ARN déposé sur un filtre de nitrocellulose.

On a déposé :

- 1 -10 μ l d'ARN isolé à partir de 10^6 cellules en 1
- 2 -20 μ l d'ARN isolé à partir de $2 \cdot 10^6$ cellules en 2
- 3 -contrôle : dépôt de 10 μ l d'une solution saline (SSC 10X).

E. Northern blot

Matériel : appareil photo polaroïd utilisant un film type 667 (3000 ASA).

L'expérience finale est réalisée : isolation des ARN, séparation par électrophorèse (fig. 71), transfert sur nitrocellulose, hybridation et révélation. L'électrophorèse nous permet de visualiser les deux bandes d'ARNr 28 S et 18 S. Les ARNm ne sont pas visibles aux UV. La peroxydase est révélée à la DAB ainsi qu'en chémoluminescence (photo).

Nous avons utilisé de l'ARN isolé à partir de 2.10^6 cellules.

Les concentrations des différents réactifs utilisés sont celles qui ont été optimisées ci-dessus.

Résultats :

-révélation en chémoluminescence avec prise d'une photo (fig. 72):

Nous observons une bande lumineuse

Nous remarquons également un bruit de fond dû à l'adsorption non spécifique de l'avidine sur le filtre de nitrocellulose.

Le bruit de fond devrait être éliminé. On peut envisager d'utiliser la streptavidine comme indiqué ci-dessus.

-révélation à la DAB (fig. 73):

Nous avons utilisé le même filtre de nitrocellulose que celui qui a été utilisé en chémoluminescence. Cela ne pose pas de problème car ces deux systèmes de révélation utilisent des substrats différents.

Nous obtenons un précipité au même endroit que celui observé en chémoluminescence.

On peut donc conclure qu'il est possible par cette technique de révéler

une sonde nucléique en chémoluminescence.

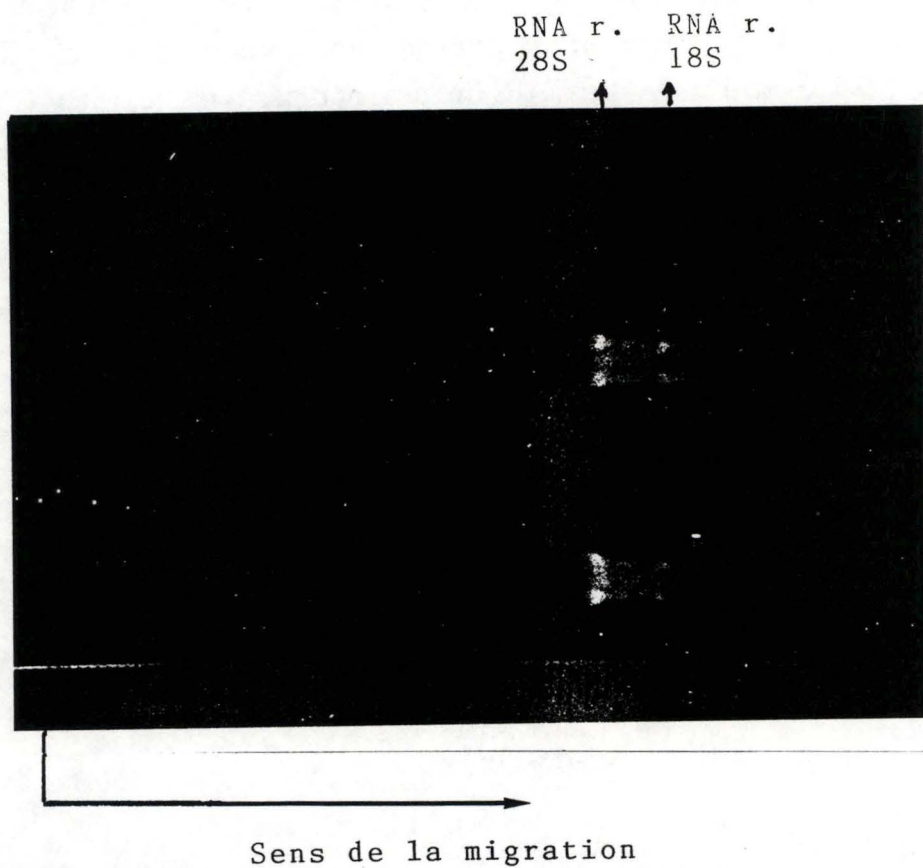


Fig. 71 : Représentation photographique (visualisation aux UV) de la séparation de l'ARN total par électrophorèse en gel d'agarose
La migration se fait de gauche à droite (le zéro de la règle indique le début de la migration).

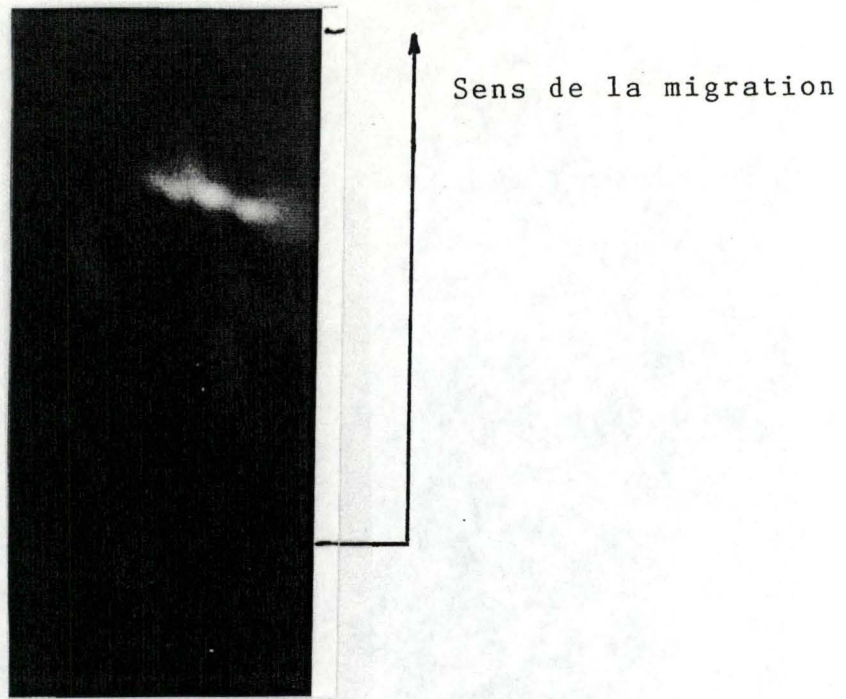


Fig. 72 : Northern blot révélé en chémoluminescence

L'ARN échantillon est issu de 10^6 cellules

La mesure de l'activité est réalisée au moyen d'une photo
Polaroid 3 000 ASA.

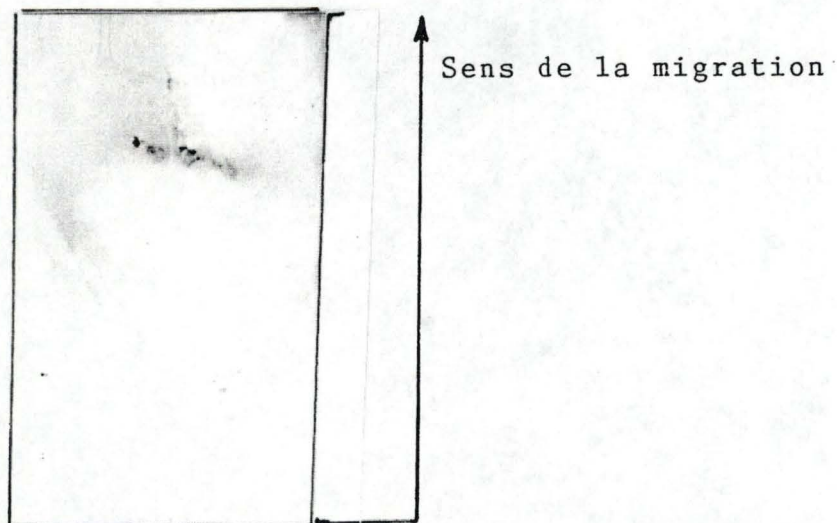


Fig. 73: Northern blot révélé à la DAB

Le filtre de nitrocellulose est le même que celui qui a été
révélé en chémoluminescence.

CHAP. IV PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

La mise au point d'une méthode de dosage d'acide nucléique (ARN) par hybridation avec une sonde nucléique froide révélée par une méthode de chémoluminescence a été réalisée, les objectifs premiers de ce travail ont donc été atteints.

Si les résultats sont positifs, ils ne sont pas encore probants puisque nous avons utilisé une sonde contre des ARN se trouvant en grande quantité dans les cellules. De plus, les problèmes d'adsorption non spécifique ont été posés tout au long du travail et ils restent un élément limitatif important qu'il faudra améliorer.

Si on veut se placer sur le marché des sondes moléculaires, dans un avenir proche, il faudra pouvoir proposer des sondes commodes d'emploi, fiables et capables de conduire à des tests automatisables. Pour relever ce défi, les sondes devront se soumettre aux critères suivants :

- Les sondes seront des oligonucléotides probablement synthétisés chimiquement avec un système de révélation direct et non-radioactif.
- La méthode doit permettre la diminution du temps nécessaire à l'hybridation et à sa mise in évidence.
- La procédure de détection ne devrait pas nécessiter l'isolement et la purification des échantillons d'acides nucléiques.

C'est pour ces raisons qu'il sera intéressant de procéder à l'hybridation de la sonde sur l'ADN à tester *in situ* plutôt que de réaliser un Northern blot.

En effet, l'hybridation *in situ* ne nécessite pas la purification des acides nucléiques à analyser et peut être réalisée sur le site même de l'infection, ce qui représente un gain de temps considérable.

Ceci est d'autant plus attrayant pour la luminescence que l'on peut réaliser des photos et que l'on sera peut-être capable de localiser ainsi les cellules positives.

D'autre part, le système de détection mis au point et utilisant la peroxydase en tant qu'enzyme marqueur n'est pas des plus sensibles et on pourrait utiliser d'autres systèmes d'émission de lumière.

CHAP. V BIBLIOGRAPHIE

ALEXANDRE, I., (1988),

Mise au point d'un système de dosage des pesticides organophosphorés et carbamates en chémoluminescence en chémoluminescence, mémoire de licence en sciences biologiques, FUNDP, Namur.

AL-HAKEEM, M., SOMMER, S.S., (1987),

Anal. Biochem., Vol. 163, PP.433-439.

AVREMEAS, S., (1969),

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde, in AVREMEAS, S., Immunichemistry, Great Britain, Pergamon Press, vol.6, pp. 43-32.

AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T., GUESDON, J.-L., (1978),

Coupling of enzymes to antibodies and antigens, Scand.j.Immunol., vol.8, suppl. 7, pp. 7-23.

BALAGUER, P., TEROUANNE, B., BOUSSIUX, A.-M.,

NICOLAS, J.-C., (1989),

Use of bioluminescence in nucleic acid hybridization reactions, Journal of bioluminescence and chemiluminescence, vol.4, pp. 302-309.

BASHIR, R., HOCHGBERG, F., SINGER, R.H., (1989);

Detection of Epstein-Barr virus by in situ hybridization, Am. J. Pathol., vol.135, n°6, pp. 1 035-1044.

BRICOUT, F., DENY, P., AGUT, H., GARBARG-CHENON, A.,
NICOLAS, J.C., (1988),
Utilisation des sondes à acide désoxyribonucléique en
pathologie infectieuse, La Presse Médicale, vol.17,
n°31, pp. 1 563-1 564.

BOEHRINGER-MANNHEIM,
Postfach 31020, Sandhoferstrasse 116, D-6800
Manheim 31 (RFG).

BUTLER, J.E., (1981),
The amplified ELISA : principles of and applications
for the comparative quantitation of class and subclass
antibodies and the distribution of antibodies and
antigens in biochemical separates, Methods in
Enzymology, vol.73, pp. 482-521.

CAMPBELL, A.K., (1986),
Chemiluminescence in the research and clinical
laboratory, TIBS, vol.11, pp. 104-107.

CHAMPIAT, D., PHILIPPE, M., VOLAT, B., MILLET, J.L.,
LACAMBRA, M., (1987),
La bioluminescence : une méthode d'analyse à large
spectre, Analysis, vol.15, n°8, pp. 11-14.

CHANTRATITA, W., HENCHAL, E.A., YOOSOOK, C., (1989),
Rapid detection of herpes simplex virus DNA by in
situ hybridization with photobiotin-labelled double-
stranded DNA probes, Molecular and Cellular Probes,
vol.3, pp.363-373.

CHIRON,
4060 Horton Street, Emeryville, Ca 94608, USA.

- CHRYSOGELOS, S., RILEY, D.E., STEIN, G., STEIN, J., (1985),
A human histone H4 gene exhibits cell
cycle-dependent changes in chromatin structure that
correlate with its expression, Proc. Natl. Acad. Sci.,
vol.82, pp. 7 535-7 539.
- DE LUCA, M., Mc Elroy, (1978),
Bioluminescence and chemoluminescence, Methods in
Enzymologie, Vol 57, p3.
- DOYE, A., (1987),
Utilisation de la détection d'H₂O₂
en chémoluminescence pour la mise au point de
dosages sensibles de la catalase et de la glutathion
peroxydase, mémoire de licence en sciences
biologiques, FUNDP, Namur.
- DURAND, B., (1988),
Le transfert des acides nucléiques sur membranes, Le
technoscope de Biofutur, n°18, pp. 3-13.
- ENGVALL, E., (1980),
Enzyme immunoassay ELISA and EMIT, Methods
enzymol., vol.70, pp. 419-439.
- ENZO-BIOCHEM, 325 Hudson Street, New-York,
NY 10013, USA.
- GARUTI, G.M.D., BOSELLI, F.M.D., GENAZZANI, A.R.M.D.,
SILVESTRI, S.P.D., RATTI, G.P.D., (1989),
Detection and typing of human papillomavirus in
histologic specimens by in situ hybridization with
biotinylated DNA probe, A.J.C.P., vol 82, pp. 604-612.

GEIGER, R., HAUBER, R., MISKA, W., (1989),

New, bioluminescence-enhanced detection systems for use in enzyme activity tests enzyme immunoassays, protein blotting and nucleic acid hybridization, Molécular and Cellular Probes, vol. 3, pp. 309-328.

GENE-PROBE INC,

9880 Campus Point Drive, San Diego, Ca 92101, USA.

GIBCO-BRL,

Rue des rosiers 14, BP 7050, 95051 Gercy Pontoise, France.

GIAID, A., HAMID, Q., ADAMS, C., SPRINGALL, D.R.,
TERENGI, G., POLAK, J.M., (1989),

Non-isotopic RNA probes, Histochemistry, vol 229, pp. 191-196.

GREEN, N.M., (1975),

Avidin, Advances in Priotein Chemistry, vol.29, pp. 85-133.

GUDKOV, A.V., KASHKIN, K.N., ZAITSEVSKAYA, T.E.,
TROYANOVSKY, S.M., (1989),

Histo-blotting : hybridization in situ detection of specific RNAs on tissue sections transferred on nitrocellulose, Int J. Cancer, vol.44, pp. 1 052-1 056.

GUESDON, J.-L., TERNYNCK, T., AVRAMEAS, S., (1979),

The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, J. Histochem. Cytochem., vol.27, n°8, pp. 1 131-1 139.

HAUBER, R., GEIGER, R., (1988),

A sensitive, bioluminescent-enhanced detection method for DNA dot-hybridization, Nucleic Acids Research, vol.16, n°3, pp. 1 213.

HAUBER, R., MISKA, W., SCHLEINKOFER, L., GEIGER, R., (1988),

The application of a photon-counting camera in very sensitive, bioluminescence-enhanced detection systems for protein blotting, J. Clin. Chem. Biochem., vol;26, n°3, pp. 148-148.

HELLER, M.J., MORISSON, L.E., (1985),

in rapid detection and identification of infection agents (KINGSBYRY, D.T., FALKOW, S.,eds.) , Academic Press New-York, PP 245-246.

HERZBERG M., (1988),

les sondes froides et la détection génétique directe, Biofutur, Vol. 71, supp n°22, PP. 14-19.

KIEL, J.L., (1983),

Microwave effects on immobilized peroxidase chemiluminescence, Bioelectromagnetics, vol.4, pp. 193-204.

KRICKA, L., J., THORPE, G.H.G., (1986),

Photographic detection of chemiluminescent and bioluminescent reations, Methods in enzymology, vol.133, pp. 404-411.

KRICKA, L.J., WHITEHEAD, T.P., (1987),

Chemiluminescent and bioluminescent immunoassays, Journal of Pharmaceutical and Biomedial Analysis, vol.5, n°8, pp. 829-833.

LARSSON, L-I., (1989),

In situ hybridization using biotin-labeled oligonucleotides : probe labeling and procedures for mRNA detection, Arch. Histol. Cytol., vol.52, pp. 55-62.

LEBACQ, P., (1987),

Spécifiques, sensibles et inoffensives : voici les sondes nucléiques non-radioactives, Le technoscope de Biofutur, n°11, pp. 12-18.

LEVI, J.E., DELCELO, R., ALBERTI, V.N., TORLONI, H., VILLA L.L., (1989),

Human papillomavirus DNA in respiratory papillomatosis detected by in situ hybridization and the polymerase chain reaction, Am. J. Pathol., vol. 135, n°6, pp.1 179-1 184.

LOURTIE, P., travail inédit.

McLNNES, J.L., VISE, P.D., HABILI, N., SYMONS, R.H., (1987),

Chemical biotinylation of nucleic acids with photobiotin and their use as hybridization probes, Focus, vol.9, n°4, pp. 1-4.

MATTHEWS J.A., KRICKA L.J., (1988),

Analytical strategie for the use of DNA probes, Analytical biochemistry, Vol.69, PP. 1-25.

MERTZ, B., (1987),

DNA Probes promise to transform diagnosis of infectious disease, Medical News and Perspectives, n°3, vol.258, pp. 301-302.

NEWMAN, C.L., MODLIN, J., YOLKEN, R.H., VISCIDI, R.P.,
(1989),

Solution hybridization and enzyme immunoassay for
biotinylated DNA-RNA hybrids to detect enteroviral
RNA in cell culture, Molecular and Cellular Probes,
vol.3, pp. 375-382.

ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEM,

1019 Mark Avenue, Carpentinria, Ca 93103, USA.

PASTEUR (Institut),

25/28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France.

PAULI, U., CHRYSOGELOS, S., STEIN, J., NICK, G., (1987),

Protein-DNA interactions in vivo upstream of a cell
cycle-regulated human H4 histone gene, *Science*,
vol.236, pp. 1 308-1 311.

PBS ORGENIC,

47 Rue Charles Heller, BP 107,
94402 Vitry-Sur-Seine, France.

PRICHARD, P.M., CORMIER, M.J., (1968),

Studies on the mechanism of the Horseradish
Peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of
luminol, Biochem. Biophys. res. Commun., vol.31, n°1,
pp. 131-136.

SCHNEPPENHEIM, R., RAUTENBERG, P.,

A luminescence western blot with enhanced sensitivity
for antibodies to human immunodeficiency virus,
Notes, vol.6, n°1, ppL 49-51.

SCHRAM, E., (1981),

Critical appreciation of luminescent techniques, in Monoclonal antibodies and development in immunoassay, (ALBERTINI, A., EKINS, R., eds), North holland biomedical press, pp. 191-192.

SCHRAM, E., (1981),

Present and future applications of luminescence assays in clinical chemistry, in Monoclonal antibodies and development in immunoassay, (ALBERTINI, A., EKINS, eds.), North holland biomedical press, pp .123-133.

STRASBURGER, C.J., KOHEN, F., (1989),

Chemiluminescent labelled streptavidin (STAV) as a universal marker in steroid and peptide immunoassays, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 4, pp. 112-118.

THOMAS, P.S, (1980),

Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.77, n°9, pp. 5 201-5 205.

THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., (1986),

Enhanced chemiluminescent assays for horseradish peroxidase : characteristics and applications, in bioluminescence and chemiluminescence, (SCHOLMERICH, J., ANDREESEN, R., KAPP, A.,ERNST, M., WOODS, W.G., eds.), Great Britain, pp. 199-208.

THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., GILLESPIE, E., MOSELEY, S.,

AMESS, R., BAGGETT, N., WHITEHEAD, T.P., (1985), Enhancement of the Horseradish Peroxidase-Catalyzed Chemiluminescent oxidation of cyclic Diacyl Hydrazides by 6-Hydroxybenzothiazoles, Anal. Biochem., vol.145, pp. 96-100.

THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., MOSELEY, S.,B., WHITEHEAD, T.P., (1985),

Phenols as enhancers of the chemiluminescent Horseradish peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction : application in Luminescence-Monitored enzyme Immunoassays, Clin. chem., vol.31, n°8, pp. 1 335-1 341.

TIJSSEN, P.,(1985),

Properties and preparation of enzymes used in enzyme-immunoassays, Practice and theory of enzyme immunoassays, vol.15, pp. 175-179.

TIJSSEN, P.,(1985),

Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays, Practice and theory of enzyme immunoassays, vol.15, pp. 21-23.

URDEA, M.S., (1988),

A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzymes labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes, Nucleic Acids Research, vol.16, n°11, pp.4 937-4 957.

VACHEREAU, A., (1989),

Luminescent immunodetection of western-blotted proteins from coomassie-stained polyacrylamide gel, Anal. Biochem., vol.179, pp. 206-208.

WILCHEK, M., BAYER, E.A., (1989),

Avidin-biotin technology ten years on : has it lived up to its expectations ?, TIBS, vol.14, pp. 408-412.

WILSON, M.B., NAKANE, P.K., (1978),

Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, (KNAPP, W., HOLUBAR, K., WICK, G., eds.), North-Holland, Biomedical Press, pp. 215-224.

WISDOM, G.B., (1976),

Enzyme-Immunoassay, Clin. Chem., vol.22, n°8, pp. 1 243-1 255.

ZREIN, M., DE MARCILLAC, G., VAN REGENMORTEL, M.H.V., (1985),

Quantitation of rheumatoid factors by enzyme immunoassay using biotinylated human IgG, J. Immunol. Methods, vol.87, pp. 229-237.