

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2^e exemplaire

UNIVERSITE Joseph FOURIER – GRENOBLE I – Sciences Technologie Médecine



U.F.R DE PHARMACIE

Domaine de la Merci – La Tronche

ANNEE : 1994

N° D'ORDRE : 7037

**APPORT DE LA PCR DANS LES METHODES DE
BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES
AU DIAGNOSTIC DES ADENOMES HYPOPHYSAIRES**

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE I

pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

M. Yves ROSUEL

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 9 Septembre 1994.

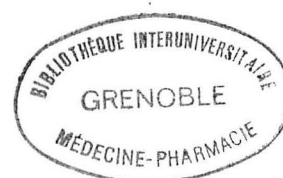
Devant **Melle le Professeur C.AGNIUS-DELDORD**, Président du Jury

et

M. le Professeur M.COMET

M. le Professeur J.ROCHAT

Mme M.VINDIMIAN, Ingénieur en Chef



UNIVERSITE Joseph FOURIER – GRENOBLE I – Sciences Technologie Médecine

U.F.R DE PHARMACIE

Domaine de la Merci – La Tronche

ANNEE : 1994

N° D'ORDRE :

**APPORT DE LA PCR DANS LES METHODES DE
BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES
AU DIAGNOSTIC DES ADENOMES HYPOPHYSAIRES**

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE I

pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

M. Yves ROSUEL

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 9 Septembre 1994.

Devant **Melle le Professeur C.AGNIUS-DELORD**, Président du Jury

et

M. le Professeur M.COMET

M. le Professeur J.ROCHAT

Mme M.VINDIMIAN, Ingénieur en Chef



REMERCIEMENTS

A Mademoiselle le Professeur C.AGNIUS-DELORD, Président de thèse,

Pour sa compétence, sa gentillesse et sa grande disponibilité à mon égard.

Elle me fait le grand honneur de présider cette thèse, qu'elle trouve ici la marque de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur M.COMET,

Les 2 années passées dans son service resteront pour moi un excellent souvenir.

Je suis très heureux qu'il ait accepté de siéger dans mon jury.

Qu'il trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur J.ROCHAT,

Je suis très honoré de le compter dans mon jury.

Je le remercie sincèrement de sa grande amabilité et de l'aide apportée.

A Madame M.VINDIMIAN, Ingénieur en Chef,

Je la remercie vivement de ses précieux conseils pour l'élaboration de cette thèse.

Je lui suis reconnaissant d'avoir accepté de siéger dans mon jury.

Ma gratitude à :

Mademoiselle G.MEFFRE, Docteur en Pharmacie,
sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Mes parents,

Mes frères,

Mes Grands-Parents,

Toute ma Famille,

Tous mes Amis,

Mademoiselle H.GRANGER.

PLAN

ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE

RAPPELS PHYSIOPATHOLOGIQUES :

I – L'ANTEHYPOPHYSE :

- 1 – La prolactine
- 2 – L'hormone de croissance

II – LES TUMEURS HYPOPHYSAIRES :

- 1 – Les prolactinomes
- 2 – Les adénomes somatotropes
- 3 – La maladie de Cushing
- 4 – Autres adénomes sécrétants
- 5 – Adénomes non sécrétants :
adénomes chromophobes

METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE :

I – EXTRACTION DES ARN TOTAUX :

1 – Intérêt

2 – Méthode :

2.1 Choix de la méthode : isolement des ARN totaux par extraction au thiocyanate de guanidine – phénol – chloroforme

2.2 Protocole :

2.2.1 Réactifs

2.2.2 Procédé expérimental

3 – Résultats :

3.1 Contrôle de qualité : électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthyldium

3.2 Détermination spectrophotométrique des taux d'ARN :

3.2.1 Principe

3.2.2 Tableau des résultats

3.3 Conclusion

II – ANALYSE DES TRANSCRITS : LE NORTHERN – BLOT

1 – Principe

2 – Protocole :

2.1 Préparation d'un marqueur de poids moléculaire radioactif :

2.1.1 Notions de radioprotection relatives à la manipulation du phosphore 32.

2.1.2 Réactifs

2.1.3 Protocole

2.1.4 Résultats

2.2 Electrophorèse en gel d'agarose dénaturant :

2.2.1 Réactifs

2.2.2 Protocole

2.3 Transfert sur membrane :

2.3.1 Réactifs

2.3.2 Protocole

2.4 Hybridation :

2.4.1 Marquage radioactif des sondes

2.4.2 Hybridation

2.4.3 Autoradiographie

3 – Résultats

III – LA REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION : LA RT – PCR

1 – La Reverse Transcription :

1.1 Principe

1.2 Protocole :

1.2.1 Réactifs

1.2.2 Protocole

1.2.3 Quantification de la synthèse de cDNA

2 – La Polymérase Chain Reaction :

2.1 Principe

2.2 Choix et méthode d'extension des amorces

2.3 Protocole :

2.3.1 Réactifs

2.3.2 Protocole

2.4 Contrôle du produit d'amplification par électrophorèse en minigel d'agarose :

2.4.1 Première série

2.4.2 Deuxième série

2.5 Validation du produit d'amplification par hybridation par sondes oligonucléotidiques marquées au phosphore 32 : technique du SOUTHERN – BLOT :

2.5.1 Principe

2.5.2 Protocole

2.5.3 Résultats

IV – TABLEAU RECAPITULATIF

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

ABREVIATIONS

A	:	adénine
ACTH	:	hormone adénocorticotrope
ADN (ou DNA)	:	acide désoxyribonucléique
AMV-RTase	:	Avian Myoblastosis Virus – Reverse Transcriptase
ARN (ou RNA)	:	acide ribonucléique
ARNm	:	acide ribonucléique messenger
ARNr	:	acide ribonucléique ribosomal
AS	:	activité spécifique
ATP	:	adénosine triphosphate
BBP	:	bleu de bromophénol
Bet	:	bromure d'éthyldium
C	:	cytosine
cDNA	:	acide désoxyribonucléique complémentaire
Ci	:	curie
cpm	:	coup par minute
DO	:	densité optique
dpm	:	désintégration par minute
EDTA	:	acide éthylène diaminotrétaétique
FSH	:	hormone folliculostimulante
G	:	guanine
hGH	:	hormone de croissance humaine
hPRL	:	prolactine humaine



I	:	taux d'incorporation
IGF	:	insuline like growth factor
kb	:	kilobase
LH	:	hormone de lutéinisation
M	:	molaire
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mm	:	millimètre
mM	:	millimolaire
mmol	:	millimole
MOPS	:	acide 3 – (N-morpholino) propanesulfonique
N	:	normalité
ng	:	nanogramme
nm	:	nanomètre
P32 (ou P ³²)	:	phosphore 32
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pM	:	picomolaire
PM	:	poids moléculaire
PNK	:	Polynucléotide Kinase
P/V	:	poids/volume
RNase	:	ribonucléase
RT	:	Reverse Transcription
RT-PCR	:	Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction
S	:	unité de constante de sédimentation
SDS	:	sodium dodécylsulfate
SSC	:	solution Sodium–Citrate
SSPE	:	solution Sodium–Phosphate–EDTA

T	:	thymidine
Td	:	température de dissociation
TBE	:	tampon Tris-Borate-EDTA
TSH	:	thyroestimuline
U	:	unité
μCi	:	microcurie
μg	:	microgramme
μl	:	microlitre
UV	:	ultraviolet
V	:	volt
V/V	:	volume/volume

__*__*__*__*__*__*__*__*__*__

INTRODUCTION GENERALE

Le but de ces travaux réalisés dans le Service de Médecine Nucléaire du Centre Hospitalier Régional A.MICHALLON à GRENOBLE est de caractériser qualitativement un type d'adénome hypophysaire, à l'aide de la méthode d'amplification de gènes par " Polymerase Chain Reaction " (PCR). Nous nous sommes limités à l'étude d'adénomes à prolactine ou à hormone de croissance.

En quelques années d'existence, la PCR a bouleversé les possibilités d'investigation en biologie moléculaire et en recherche médicale. Très vite, elle a dépassé le cadre de la recherche pour gagner le domaine du diagnostic, en particulier en endocrinologie.

Après un rappel physiopathologique sur l'antéhypophyse sont décrites les méthodes de biologie moléculaire utilisées, les résultats étant comparés à ceux obtenus sur coupes immunohistochimiques réalisées par le laboratoire d'anatomopathologie.

Les travaux de Ricardo V.LLOYD sur l'antéhypophyse, faisant appel à des techniques d'hybridation in situ et de " Northern Blot ", nous ont servi pour la mise au point d'une méthode PCR, basée sur la caractérisation du niveau d'expression des gènes.

RAPPELS PHYSIOPATHOLOGIQUES

I – L'ANTEHYPOPHYSE :

Situé dans la selle turcique du sphénoïde, l'antéhypophyse est le véritable chef d'orchestre du système endocrinien (8 , 12).

Cette glande est formée de cellules hormonosécrétantes organisées en cordons sans systématisation nette :

Schématiquement, on rencontre :

- Les cellules somatotropes sécrétant l'hormone de croissance (hGH) : ce sont les cellules les plus nombreuses, localisées surtout dans les ailerons latéraux.
- Les cellules sécrétant la prolactine (hPRL) : ces cellules sont moins nombreuses et ont à peu près la même localisation.
- Les cellules thyrotropes sécrétant la thyroestimuline (TSH), localisées dans la partie centrale de l'antéhypophyse.
- Les cellules corticotropes sécrétant l'ACTH, les endorphines, localisées dans les parties centrales et postérieures.
- Les cellules gonadotropes sécrétant la LH et la FSH, localisées de façon diffuse.

1 – La prolactine = hPRL

Cette hormone est formée de 198 acides aminés (8 , 12).

Elle induit et maintient la lactation.

Les taux plasmatiques de base sont de 10 µg/l chez la femme.

La sécrétion suit un rythme nyctéméral avec un pic nocturne.

Durant la grossesse, les taux plasmatiques augmentent de façon régulière à partir du premier trimestre jusqu'à 200 µg/l à terme. Pendant la lactation, cette augmentation est maintenue par un réflexe neuroendocrinien initié par la stimulation des mamelons durant les tétées.

2 – L'hormone de croissance = hGH

Elle est constituée de 191 acides aminés dont 161 sont communs à elle et à la prolactine (8, 12).

Elle entraîne la stimulation de la synthèse protéique et de la mobilisation adipeuse. De plus, elle possède un effet diabétogène.

Son action s'exerce soit de façon directe au niveau des différents tissus, soit par l'intermédiaire de seconds messagers hormonaux appelés Somatomédines ou Insuline like Growth Factor (IGF). La hGH stimule leur synthèse.

La hGH est sécrétée de façon épisodique selon un rythme nyctéméral avec une augmentation des taux plasmatiques durant la première période de sommeil. Le taux plasmatique basal est compris entre 0,5 et 5 µg/l.

II – LES TUMEURS HYPOPHYSAIRES :

(8,12)

Elles représentent environ 10 % des tumeurs intracrâniennes chez l'homme. Il s'agit d'adénomes développés à partir des différentes tumeurs antéhypophysaires. La transformation maligne est tout à fait exceptionnelle.

On distingue 2 types selon le diamètre de la tumeur :

- Les microadénomes dont le diamètre est inférieur à 10 mm,
- Les macroadénomes de diamètre supérieur à 10 mm, caractérisé par le risque d'invasion des structures voisines.

Les tumeurs particulièrement envahissantes peuvent gagner l'hypothalamus.

La symptomatologie de ces tumeurs associe, à des degrés divers, deux types d'éléments :

- le syndrome tumoral avec céphalées et troubles visuels ;
- le syndrome endocrinien, avec expression particulière selon le ou les types d'hormones hypersécrétées.

1 – Les prolactinomes :

Ils représentent 50 % des adénomes hypophysaires, atteignant le plus souvent des adultes de 20 à 40 ans.

Ce sont les femmes les plus touchées (83 % des cas), en général sous forme de microadénomes. Chez l'homme il s'agit le plus souvent de formes envahissantes.

Les troubles rencontrés chez la femme sont : l'aménorrhée, la galactorrhée, une baisse de la libido et un syndrome tumoral.

Chez l'homme, le diagnostic est souvent tardif, occasionné par la survenue du syndrome tumoral. On remarque une baisse de la libido, des troubles de l'érection, une gynécomastie.

Le taux basal de PRL est toujours supérieur à la normale (supérieur à 30 ng/ml), dû à l'hypersécrétion des cellules tumorales. Les valeurs plasmatiques sont corrélées à la masse tumorale. Il y a perte du rythme nyctéméral traduisant la sécrétion autonome de l'adénome.

2 – Les adénomes somatotropes :

Ils représentent 25 % des adénomes hypophysaires, touchant également les deux sexes, le plus souvent entre 30 et 50 ans.

On retrouve un tableau classique de dysmorphisme acromégalique lié à une hypersécrétion de hGH, permanente et non freinable.

L'action de la hGH se fait par l'intermédiaire de la Somatomédine C, entraînant une prolifération cartilagineuse et un épaissement des os courts.

A l'hypersécrétion de hGH peut s'ajouter celle d'autres hormones rendant le tableau plus complexe.

Le cas le plus fréquent est l'hypersécrétion associée de prolactine, réalisant le tableau de l'adénome somato-mammotrope (20 % des cas d'acromégalie).

3 – La maladie de Cushing :

Il s'agit d'un adénome hypophysaire corticotrope, microadénome dans 90 % des cas, 3 à 8 fois plus fréquent chez la femme, le plus souvent entre 30 et 50 ans.

Il représente 5 % des cas d'adénomes hypophysaires.

Il y a alors hyperstimulation surrénalienne d'où production excessive d'androgènes.

Le syndrome tumoral est le plus souvent absent.

4 – Autres adénomes sécrétants :

Ils sont beaucoup plus rares.

- Adénomes thyroïdiques : hypersécrétion de TSH et de sa sous-unité avec hyperthyroïdie.
- Adénomes gonadotropes : hypersécrétion des gonadotrophines.

5 – Adénomes non sécrétants : adénomes chromophobes :

Ils représentent 20 % des adénomes.

En général le syndrome tumoral est très marqué car il s'agit de tumeurs volumineuses. Le plus souvent, ils se déclarent après 50 ans et se manifestent à un stade avancé de l'évolution.

Dans 25 % des cas, les patients ne présentent aucun déficit endocrinien.

Dans 75 % des cas, on retrouve une panhypopituitarisme avec déficit de la fonction gonadotrope en premier lieu.

METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

I – EXTRACTION DES ARN TOTAUX :

1 – Intérêt :

Etape préliminaire, indispensable à l'étude de l'expression génique par " NORTHERN-BLOT " et RT – PCR ", la méthode choisie doit permettre l'extraction des ARN totaux de qualité et pureté optimales à partir de quantités limitées de matériel biologique (2, 15, 24).

2 – Méthode (d'après 3) :

2.1 Choix de la méthode : isolement des ARN totaux par extraction au Thiocyanate de Guanidine – Phénol – Chloroforme (3, 6, 15, 24).

Le thiocyanate de guanidine, dénaturant protéique très efficace, est en même temps un puissant inhibiteur des ribonucléases (RNases) quand il est associé au bétamercaptoéthanol.

Combinant extraction au thiocyanate de guanidine et extraction phénol – chloroforme, la méthode de CHOMCZYNSKI et SACCHI remplace avantageusement le protocole par ultracentrifugation au thiocyanate de guanidine en gradient de chlorure de césium (méthode longue et lourde) ou l'extraction classique au phénol – chloroforme (ARN souvent dégradé).

Ce procédé rapide permet l'obtention d'ARN totaux non dégradés et de grande qualité à partir de très faibles quantités de tissus ou de cellules.

2.2 Protocole :

2.2.1 Réactifs

- . Solution dénaturante = Solution D.
- 4M Thiocyanate de Guanidine
- 25 mM Citrate de Sodium pH = 7,0
- 0,5 % N – Lauryl Sarcosine
- 100 mM Bétamercaptoéthanol

- .Phénol saturé en eau
- .Dextran T 40 à 5 mg/ml
- .SEVAG = Chloroforme : Isoamylalcool (24:1)
- .Isopropanol
- .Ethanol
- .2M Acétate de Sodium pH = 4,0
- .2M Acétate d'ammonium

2.2.2 Procédé expérimental

Travailler dans la glace pilée

*EXTRACTION :

50 à 70 mg de tissus broyés et homogénéisés dans 1 volume de solution D (500 μ l) puis addition successive de :

- 1 μ l Dextran T 40
- 0,1 volume 2M Acétate de Sodium pH = 4,0
- 1 volume Phénol
- 0,2 volume SEVAG

Après agitation énergique et attente 15 minutes dans la glace, centrifuger 20 minutes à 12000 g à + 4° C. (Centrifugeuse de paillasse 2K15 [SIGMA]).

*PRECIPITATION N° 1 :

Reprise de la phase aqueuse supérieure par 1 volume d'isopropanol et laisser 2 heures à - 20° C.

Ensuite centrifuger 20 minutes à 12000 g à + 4° C.

*PRECIPITATION N° 2 :

Culot repris dans 0,5 volume de solution dénaturante puis addition d'1 volume d'Isopropanol.

Attente de 2 heures à - 20° C.

Centrifugation 20 minutes à 12000 g à + 4° C.

* PRECIPITATION N° 3:

Culot repris dans 0,5 volume de H₂O ; 0,1 volume de M Acétate d'Amonium et 2,5 volumes d'Ethanol absolu.

Attente de 2 heures à – 20°C.

Centrifugation 20 minutes à 12000G. à + 4°C.

* LAVAGE :

Lavage du culot par 1 volume d'Ethanol à 70 % puis sédimentation et séchage sous vide.

* SOLUBILISATION :

Solubilisation finale du culot dans H₂O et stockage à – 20°C ou – 80 °C (si longue période).

3 – Résultats :

3.1 Contrôle de qualité : électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthyidium.

L'ARN extrait doit satisfaire à deux critères de qualité (24) :

- * L'absence de dégradation par les ribonucléases : elle est déterminée par l'intégrité des bandes 28S et 18S des ARN ribosomiaux.

Si l'ARN est intact, ces bandes sont nettement visibles, la bande 28S (4,7 kb) étant deux fois plus intense que celle de 18S (1,9 kb).

- * L'absence de contamination par de l'ADN génomique lors de l'extraction.

L'électrophorèse étant réalisée en simple gel d'agarose à 1,2 %, une légère dégradation inhérente à cette méthode (gel non dénaturant) est visible au-delà du front de solvant.

Par commodité, les adénomes sont numérotés A1, A2,A6

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Dépôt	PM1	-	A1	A1'	A2	A3	A3'	A4	A4'	A5	A6	A6'	-	PM2	-	-

PM1 : 2 μ l PM II BOEHRINGER (500ng) = Phage λ digéré par l'enzyme Hind III.

PM2 : 2 μ l PM III BOEHRINGER (500 ng) = Phage λ digéré par les enzymes Hind III et Eco R1.

Dépôts des adénomes : 1 μ l

Gel d'agarose à 1,2 % dans TBE x 1
(Cf. figure 1).

λ <i>Hind</i> III	λ <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI
23,130	21,226
9,416	5,148
6,557	4,973
4,361	4,268
2,322	3,530
2,027	2,027
564	1,904
125	1,584
	1,375
	947
	831
	564
	125

FIGURE 1 : taille des fragments des poids moléculaires λ Hind III et λ Hind III – EcoR 1 exprimée en paires de base.

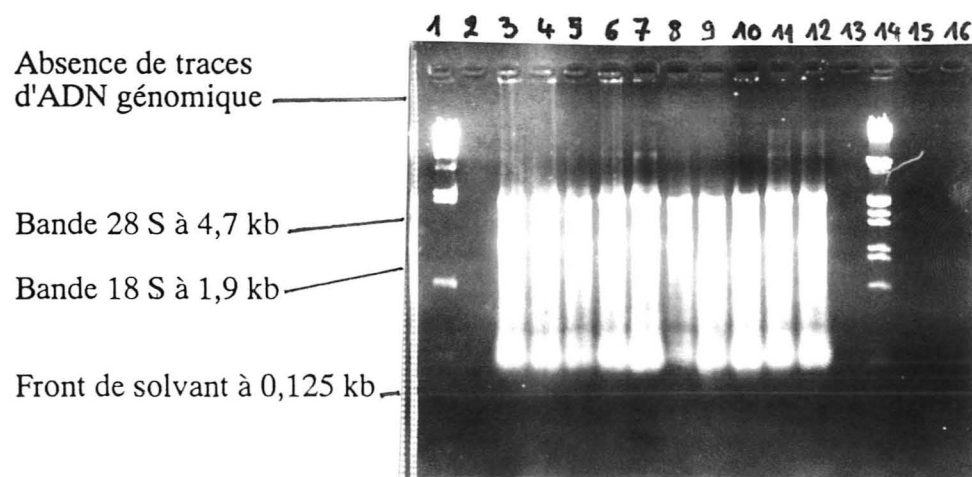


Photo du gel d'électrophorèse du contrôle d'extraction des ARN totaux.

3.2 Détermination spectrophotométrique du taux d'ARN

3.2.1 Principe :

La quantification des ARN totaux extraits se fait par mesure spectrophotométrique de la quantité d'irradiation UV absorbée par les bases puriques et pyrimidiques (2, 5, 15, 17, 24).

Les lectures de densité optique sont réalisées à 260 nm et 280 nm.

- L'absorbance à 260 nm permet le calcul de la concentration d'ARN dans l'échantillon sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à environ 40 µg/ml d'ARN.
- Le rapport $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ donne une estimation de la pureté des échantillons en ARN.

Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0.

S'il y a contamination (protéines, phénol, autres acides nucléiques...), ce rapport est significativement abaissé et ne permet plus une estimation exacte des taux d'ARN.

(limite de détection de la méthode = environ 0,25 µg/ml).

3.2.2 Tableau des résultats :

TISSU	Volume d'H ₂ O d/lequel est repris le culot	Dilution	A 260 nm	A 280 nm	A 260 nm A 280 nm	Concentration calculée en µg/µl	Quantités extraites en µg
A1	20	1/100	0,424	0,217	1,954	1,70	34)
A1'	20	1/100	0,133	0,065	2,046	0,53	) 44 10)
A2	60	1/100	0,097	0,046	2,108	0,39	23
A3	60	1/100	0,167	0,081	2,062	0,67	40)
A3'	40	1/100	0,377	0,189	1,995	1,51	) 100 60)
A4	40	1/100	0,304	0,150	2,027	1,22	48)
A4'	40	1/100	0,400	0,199	2,010	1,60	) 112 64)
A5	60	1/100	0,135	0,064	2,109	0,54	31
A6	20	1/100	0,310	0,148	2,095	1,24	24)
A6'	20	1/100	0,101	0,045	2,244	0,40	) 32 8)

Les mesures d'absorbance sont réalisées sur le spectrophotomètre d'analyse UV / Visible, série DU®60 BECKMAN.

3.3 Conclusion :

- Le contrôle de qualité révèle la présence de bandes 28 S et 18 S des ARN ribosomiaux et l'absence de traces d'ADN génomique.
- Le calcul des absorbances à 260 nm et 280 nm nous conduit à des rapports A260 nm/A280 nm corrects, indiquant l'absence de contaminations protéïques, phénoliques ou d'autres acides nucléiques.

La pureté et l'intégrité des ARN extraits permettent donc de poursuivre l'étude.

II – ANALYSE QUALITATIVE DES TRANSCRITS : le NORTHERN – BLOT

1 – Principe :

Le NORTHERN – BLOT permet une analyse qualitative et semi-quantitative des ARN (2, 24).

Cette technique permet de visualiser un ARN spécifique au sein d'une population hétérogène quand on possède une sonde reconnaissant au moins 20 bases de la partie codante du gène correspondant.

Cette visualisation permet :

- d'affirmer la présence ou l'absence d'un ARN dans la cellule qui a servi à sa préparation.
- de déterminer la taille de cet ARN.
- d'apprécier des variations quantitatives de cet ARN d'un type ou d'un état cellulaire à l'autre (semi-quantitatif).

Les ARN étant des entités isolables, contrairement aux gènes, il n'est pas nécessaire de faire appel aux enzymes de restriction. Les ARN totaux extraits sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose afin d'obtenir une séparation en fonction de leur taille en référence avec un marqueur de poids moléculaire radioactif.

Leur riche structure secondaire doit être détruite afin qu'elle n'intervienne pas dans leur mobilité. Pour cela l'électrophorèse est pratiquée en présence d'un agent dénaturant, ici le formaldéhyde.

L'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des ribonucléases, enzymes très répandues et très stables, nécessite de travailler avec un très grand soin, et dans les conditions les plus stériles possibles (port de gants indispensable, matériel et solution autoclavés).

Après électrophorèse et transfert sur membrane, l'hybridation par sonde oligonucléotidique marquée au phosphore 32 est révélée par autoradiographie (9, 11).

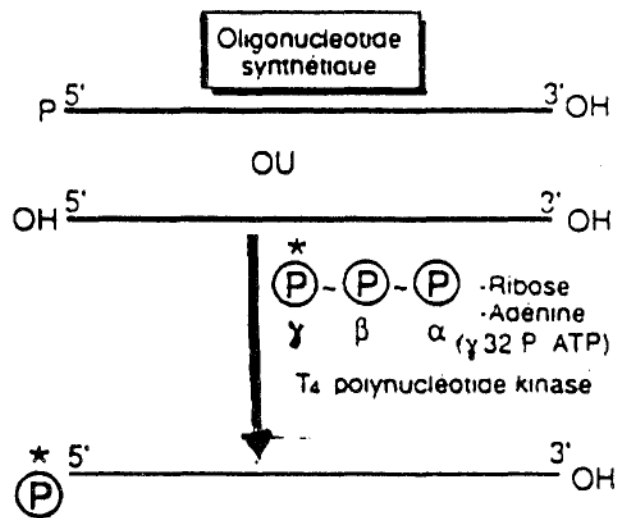


FIGURE 2 : Marquage d'oligonucléotides de synthèse en 5' par la T4 polynucléotide kinase.

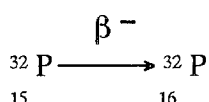
2 – Protocole :

2.1 Préparation d'un marqueur de poids moléculaire radioactif :

L'enzyme T4 polynucléotide kinase échange un groupement phosphate en extrémité 5' terminale d'un ADN en présence d'ATP ; cette réaction est d'efficacité suffisante pour la préparation de marqueurs de poids moléculaire radioactifs si l'ATP utilisé est marqué en γ par du phosphore 32 (cf. figure 2). (9, 11)

2.1.1 Notions de radioprotection relatives à la manipulation du phosphore 32 : (cf. annexe 5)

Le phosphore 32 est un élément radioactif donnant une émission β^- : émission d'un électron négatif β^- .



La période radioactive est de 14,28 jours.

Son énergie est de 1,71 MeV.

Mise en oeuvre de la protection :

Pour arrêter totalement les β^- de 1,7 MeV, il faut une épaisseur de 4 mm de verre ou de 8 mm de plexiglas.

Les gants ordinaires constituent une barrière contre la contamination mais pas contre l'irradiation externe des mains.

L'évacuation des déchets est contrôlée. L'activité initiale est réduite d'un facteur de 10 au bout de 48 jours, de 100 au bout de 96 jours, de 1000 au bout de 144 jours. Les déchets sont à conserver 4 mois dans une poubelle protectrice avant élimination avec les déchets conventionnels.

Manipulation du Phosphore 32 :

Jusqu'à 0,16 mCi , travail en zone surveillée sur paillasse

Jusqu'à 1,6 mCi , travail en zone contrôlée sur paillasse

Jusqu'à 16 mCi , travail en zone contrôlée sous hotte aspirante.

2.1.2 Réactifs :

- . tampon kinase x 10
 - { Mg Cl₂ 0,1 M
 - { Tris HCl 0,5 M ; pH = 7,6
 - { Dithiothréitol 50 mM
 - { EDTA 1 mM ; pH = 8,0
 - { Spermidine 10 mM
- . γ (³² P) ATP à 3000 Ci/mmol ; 10 μ Ci/ μ l (AMERSHAM)
- . T4 Polynucléotide Kinase à 10 U/ μ l (BIOLABS)
- . Poids moléculaire : phage Lambda digéré par l'enzyme EcoT14I en 11 fragments, dosé à 500 ng/ μ l : λ / EcoT14I (AMERSHAM)
- . Trisacryl GF 05M, de limite d'exclusion 3000 daltons (IBF)

2.1.3 Protocole :

- 500 ng de Poids Moléculaire (PM) dilué dans 19 μ l H₂O
- dénaturation 2 minutes à 95 °C et refroidissement immédiat dans la glace
- addition de :
 - . 4 μ l de tampon kinase x 10
 - . 2 μ l de γ (³²P) ATP
 - . 1 μ l de T4 polynucléotide kinase (10U)
 - . H₂O qsp 40 μ l
- incubation 30 minutes à 37°C
- purification immédiate par chromatographie de filtration sur colonne de Trisacryl GF 05 M®.

2.1.4 Résultats :

Obtention d'un poids moléculaire marqué d'activité spécifique :
 AS = $5,9 \cdot 10^6$ dpm / μ g,, soit 2,68 μ Ci/ μ g
 (1 μ Ci = $2,2 \cdot 10^6$ dpm)

Calcul :

Pour 500 ng de PM marqué et purifié, le comptage d'une aliquote de 1 μ l de PM pris sur un volume de 40 μ l donne un total de 31505 coups CERENKOV par minute, d'où une activité spécifique de $5,9.10^6$ dpm/ μ g, sachant que l'efficacité de détection est de 43 % pour le Phosphore 32 (25).

N.B : Le comptage est réalisé sur le compteur à scintillation liquide MINAXI TRI-CARB (PACKARD), par effet CERENKOV (cf. Annexe n°1).

2.2 Electrophorèse en gel d'agarose dénaturant

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques (chargées négativement) uniformément chargées. Leur migration est donc possible dans un champ électrique. La charge relative étant constante, le système de discrimination est l'effet de filtration du gel. (2, 24)

La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction de 2 paramètres:

- sa masse moléculaire, donc le nombre de paires de bases.
- la concentration en agarose du gel : dans la pratique, les concentrations en agarose sont comprises entre 0,6 et 1,5 % :

% Agarose	Taille des fragments à séparer
0,9 à 1,2	0,2 à 7 kb

2.2.1 Réactifs

- .Tampon MOPS x 10 { MOPS 0,2M
 { Acétate de Sodium 50mM
 { EDTA 10mM
 { pH = 7,0
- .Formaldéhyde : solution à 37 % (P/V)
- .Formamide désionisé sur Résine AG 501 X 8 (BIORAD)
- .Tampon de charge x6 { 0,05 % Bleu de Bromophénol (P/V)
 { 60 % Glycérol (V/V)
- .Agarose SEAKEM HGT (FMC)
- .NaOH 10N

2.2.2 Protocole :

Tout le matériel d'électrophorèse (cuve et peigne) est traité préalablement à la soude 0,4N durant 30 minutes puis lavé plusieurs fois à l'eau ultrapure stérile.

–Réalisation d'un gel d'agarose :

- { 1 % Agarose (P/V)
- { Tampon MOPS x1
- { Formaldéhyde 2,2M

–Tampon de migration { Tampon MOPS x 1
 { Formaldéhyde 2,2M

–Les échantillons sont préparés comme suit :

.8 µg d'ARN totaux qsp 10 µl H₂O

.10 µl de tampon dénaturant :

- { Formamide 50 %
- { Formaldéhyde 2,2M
- { Tampon MOPS x 1
- { Tampon de charge x 1

- puis dénaturation 2 minutes à 95° C puis refroidissement dans la glace avant le dépôt.
- L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à une migration suffisante du colorant (bleu de bromophénol).

2.3 Transfert sur membrane :

L'hybridation au sein d'un gel d'agarose étant très difficile, les fragments d'acides nucléiques séparés par électrophorèse sont transférés sur un support solide. Ce transfert est assuré par un phénomène de capillarité, d'où le nom de "blotting" donné à cette étape. (2, 24, 26)

Les membranes de Nylon activé ici utilisées sont des membranes de seconde génération, de très haute sensibilité.

Ces nouvelles membranes sont chargées positivement sur un support de Nylon. Ces propriétés physicochimiques leur apportent robustesse et facilité d'utilisation (fixation par chauffage inutile).

2.3.1 Réactifs :

- SSC x 20
 - { Citrate de Sodium 0,3M
 - { NaCl 3M
- Membrane de transfert par hybridation = Nylon chargé positivement (BOEHRINGER – MANNHEIM).

2.3.2 Protocole :

- Le transfert est réalisé en SSC x 20 par capillarité durant une quinzaine d'heures.
 La membrane découpée aux dimensions du gel est mouillée dans l'eau ultrapure puis saturée 10 minutes en SSC x 20.
 Le montage est réalisé selon le schéma suivant en évitant toute bulle d'air entre la membrane et le gel.

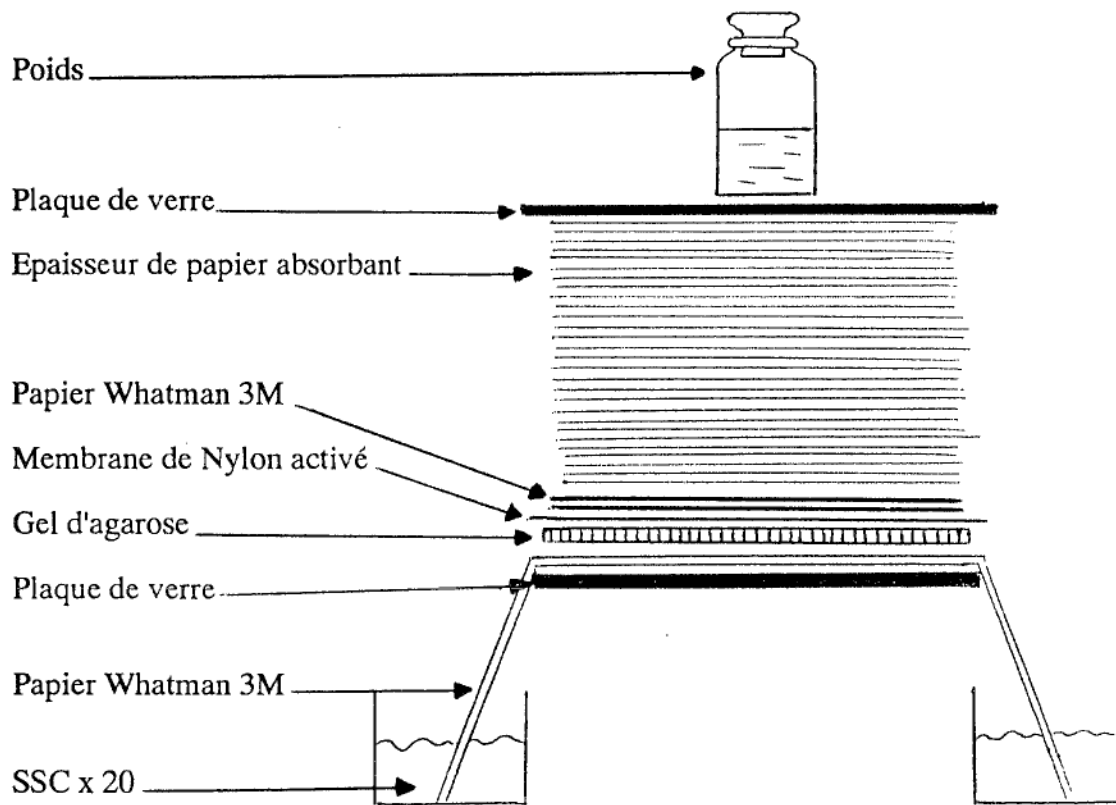


FIGURE 3 : Schéma de montage d'une technique de NORTHERN-BLOT.

- Fixation : après transfert, la membrane est traitée par NaOH 0,05 N, rincée en SSC x 2 puis séchée.

Ceci entraîne la formation de liaisons covalentes entre l'acide nucléique et la membrane, afin de supporter les traitements nécessaires à l'hybridation, et autorise de nombreuses hybridations et déshybridations successives.

2.4 Hybridation :

La règle d'appariement des bases (A–T et G–C) est la notion fondamentale sur laquelle repose la technique de l'hybridation moléculaire (2, 5, 17, 24).

Deux acides nucléiques dénaturés d'origines différentes, mélangés dans des conditions appropriées, peuvent former des hybrides s'ils possèdent des séquences complémentaires. Ainsi, une sonde spécifique d'un acide nucléique donné peut s'associer de façon stable avec une séquence homologue et le marquage préalable de la sonde permet alors la détection du duplex.

2.4.1 Marquage radioactif des sondes

Le marquage de 3 sondes oligonucléotidiques a été nécessaire pour notre étude (cf. Annexe 2) : (2, 7, 18, 19, 20, 22, 27)

- 1 sonde complémentaire de la région codante pour la séquence [66–72] de hPRL . (18, 19).
- 1 sonde complémentaire de la région codante pour la séquence [11–17] de hGH (18, 19)
- 1 sonde " 28 S rRNA " pour valider les hybridations spécifiques (référence CLONTECH).

Produites sur un synthétiseur d'oligonucléotides (GENSET pour hGH et hPRL, CLONTECH pour 28 S rRNA), ces sondes sont obtenues sous forme d'ADN simple brin. Elles ne sont marquées qu'après leur synthèse.

Le marquage que nous avons réalisé sur l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase selon le protocole décrit pour le marquage du poids moléculaire (chapitre II-2-1) a donné des sondes de haute activité spécifique : (9, 11, 25)

	GH (21 mer)	PRL (21 mer)	28S rRNA (29 mer)
Quantité de sonde	13pM = 90 ng	10pM = 70 ng	10pM = 100 ng
cpm CERENKOV sur un aliquot de 1µl sur 20 µl	411828	391322	307782
AS en dpm/µg	$2.1.10^8$	$2.6.10^8$	$1.4.10^8$

--

2.4.2 Hybridation :

Les paramètres affectant les taux d'hybridation et la stabilité des hybrides sont : (24)

- la température de fusion des hybrides T_m qui est définie comme étant la température à laquelle la moitié des hybrides est dissociée, dépendant de la composition en bases (% G+C), des microappariements isolés de bases.
- la composition du milieu dans lequel la sonde est en solution ou stringence : force ionique, pH, température, viscosité.
- la longueur de la sonde.

En pratique, pour les oligonucléotides de 14 à 27 nucléotides de long, la température de dissociation T_d est approximativement donnée par la formule :

$$T_d = 4 (G+C) + 2 (A+T) \text{ en conditions standard de } 1M Na^+.$$

Les hybridations et les lavages peuvent être réalisés à température plus basse en réduisant la concentration de Na⁺, ce qui est le cas dans le tampon d'hybridation ici utilisé : ceci permet de diminuer T_d de 10 à 15°C.

REACTIFS :

- SSPE x 20 { NaCl 3M
 { NaH₂PO₄ 0,2M ; 2H₂O
 { EDTA 20mM, pH = 8,0
- DENHARDT x 50
 { Ficoll type 400 1 % (P/V)
 { Polyvinylpyrrolidone 1 % (P/V)
 { Sérumalbumine bovine 1 % (P/V)
- SDS 10 % pH = 7,2 (Sodium dodécylsulfate)
- ADN de sperme de hareng à 4 mg/ml, soniqué et dénaturé
(BOEHRINGER-MANNHEIM).

PROTOCOLE :

Une étape préalable de préhybridation par de l'ADN hétérologue (ici de l'ADN de sperme de hareng) est nécessaire afin de saturer les sites de fixation potentiels de la membrane.

- la composition du tampon utilisé est la suivante :

{SSPE x 5
{DENHARDT x 10
{SDS 1 %

avec 100 µg/ml d'ADN hétérologue.

- la préhybridation est réalisée en sac scellé mis au bain-marie agitant à 50° C pendant au moins 1 heure.

- L'hybridation est ensuite pratiquée en ajoutant la sonde marquée choisie (1 sonde par hybridation), à raison d'environ 5.10^6 cpm/ml de tampon, et ce pendant au moins 8 heures de bain-marie agitant.

	GH (21 mer)	PRL (21 mer)	28 S rRNA (29 mer)
Td estimé	70° C	68° C	81° C
T° hybridation choisie	58° C	56° C	60° C

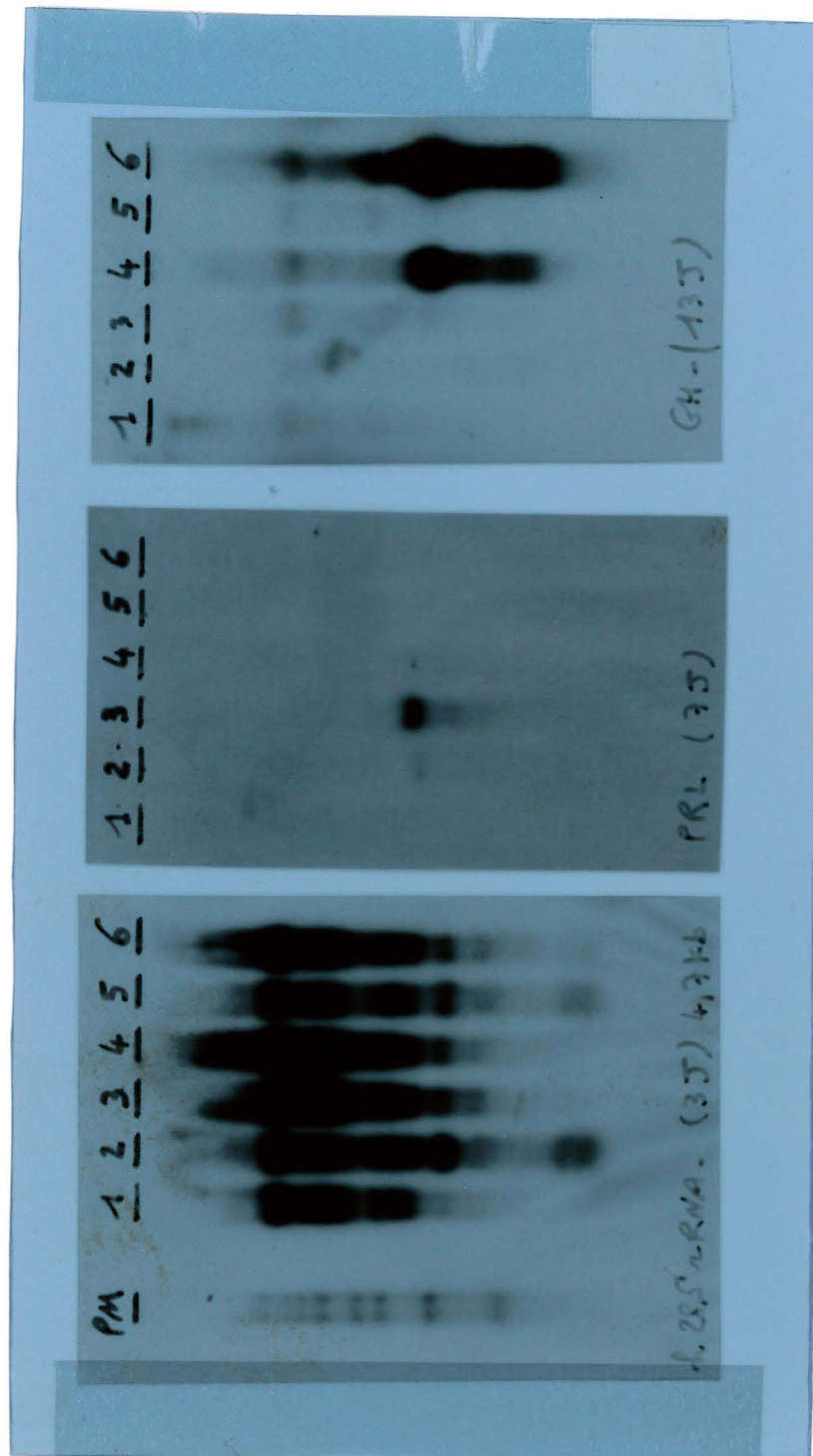
- Avant d'être mise en autoradiographie, la membrane doit être lavée. Cette étape particulièrement critique doit être conduite avec soin pour obtenir le meilleur rapport signal / bruit de fond possible.
- Le tampon de lavage utilisé (SSPE x 2 et SDS 0,5 %) durant un temps court de 10 minutes est de stringence suffisante pour les sondes oligonucléotidiques.
- Pour réhybrider avec une sonde différente, il est nécessaire de déshybrider la sonde précédente. Ceci est réalisé dans des conditions de stringence maximales : 2 minutes dans l'eau ultrapure à 100° C.

2.4.3 Autoradiographie :

Les hybrides sont révélés par autoradiographie à l'aide de films photographiques " HYPERFILM MP AMERSHAM " qui sont mis en exposition à - 80° C dans une cassette avec écran intensificateur (Cf Annexe 3).

Le temps d'exposition nécessaire est fonction de la quantité de cibles présentes.

Hybridation	hGh	hPRL	28S rRNA
Temps d'exposition	13 jours	7 jours	3 jours



REVELATION AUTORADIOGRAPHIQUE du NORTHERN-BLOT.

3 – Résultats

La même membrane du NORTHERN-BLOT a servi de support aux hybridations successives des 3 sondes oligonucléotidiques choisies.

Les autoradiographies sont rassemblées pour comparaison sur la même reproduction du film.

L'hybridation par la sonde "28S rRNA" réalisée en même milieu permet l'interprétation des deux autres :

- les ARN totaux déposés (8 μ g) sont révélés en quantité sensiblement équivalente, témoignant d'un dépôt électrophorétique et d'un transfert correct.
- le poids moléculaire bien visible permet le repérage des bandes recherchées.

Interprétation semi-quantitative:

	Expression du gène codant pour hPRL	Expression du gène codant pour hGH
Adénome A1	-	-
Adénome A2	+	-
Adénome A3	++	±
Adénome A4	±	++
Adénome A5	-	-
Adénome A6	-	+++

Cette méthode d'analyse par NORTHERN-BLOT va nous servir de référence pour la mise au point d'une méthode beaucoup plus sensible : la RT-PCR.

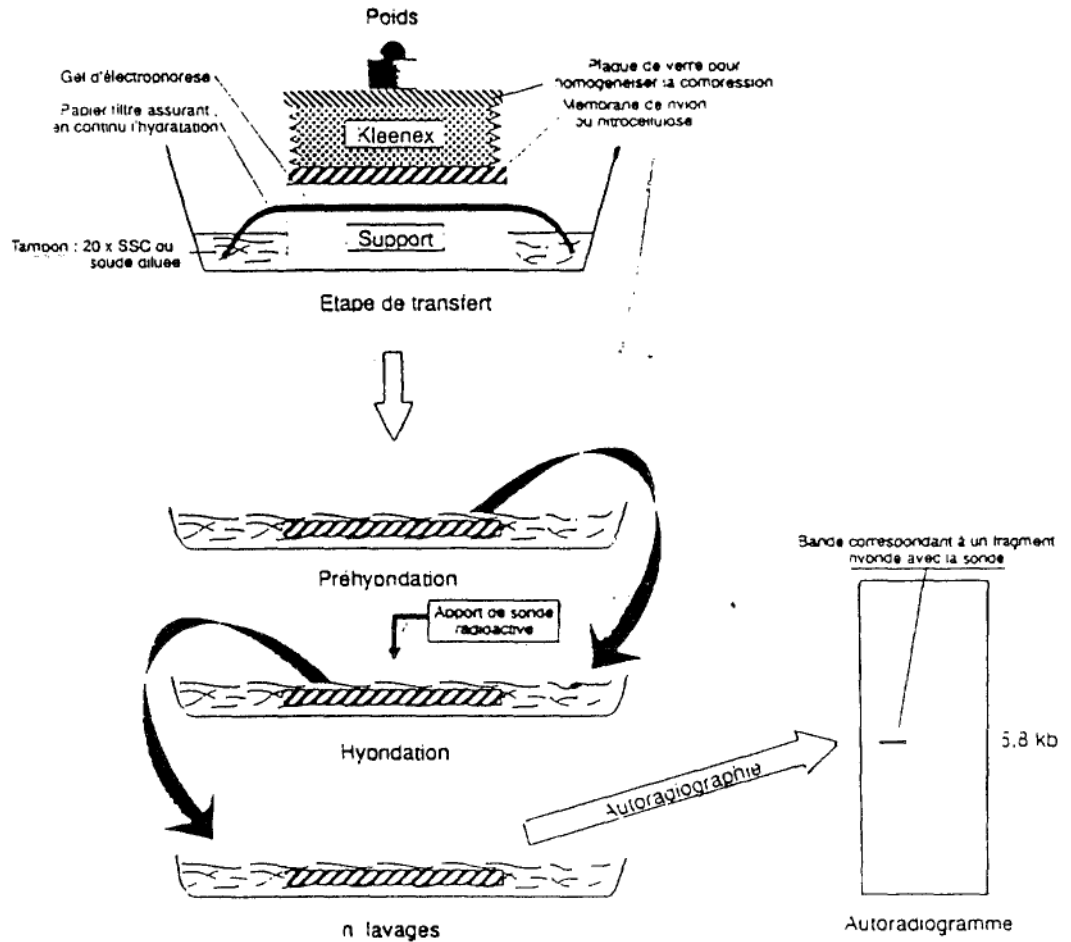


FIGURE 4 : Schéma récapitulatif de la technique du NORTHERN-BLOT.

III – LA REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION : RT-PCR

Outre la méthode d'analyse des ARN messagers par NORTHERN-BLOT (précédemment développée), la technique de RT-PCR est une autre façon originale de les étudier.

Elle devient de plus en plus utilisée pour l'analyse de la transcription des gènes car elle est rapide et hautement sensible.

Après isolement des ARN totaux à partir de tissus ou de cellules, les ARN messagers sont soumis à l'action d'une enzyme Reverse Transcriptase qui permet la synthèse d'un ADN simple-brin complémentaire = cDNA.

Une séquence déterminée de ce cDNA est ensuite amplifiée un grand nombre de fois par une réaction de PCR utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques ou "Primers", nécessaires à l'action de l'enzyme ADN polymérase.

Le produit d'amplification est alors analysé par une électrophorèse en gel d'agarose puis validé selon une technique de SOUTHERN-BLOT, c'est-à-dire hybridation de l'ADN obtenu avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées au phosphore 32.

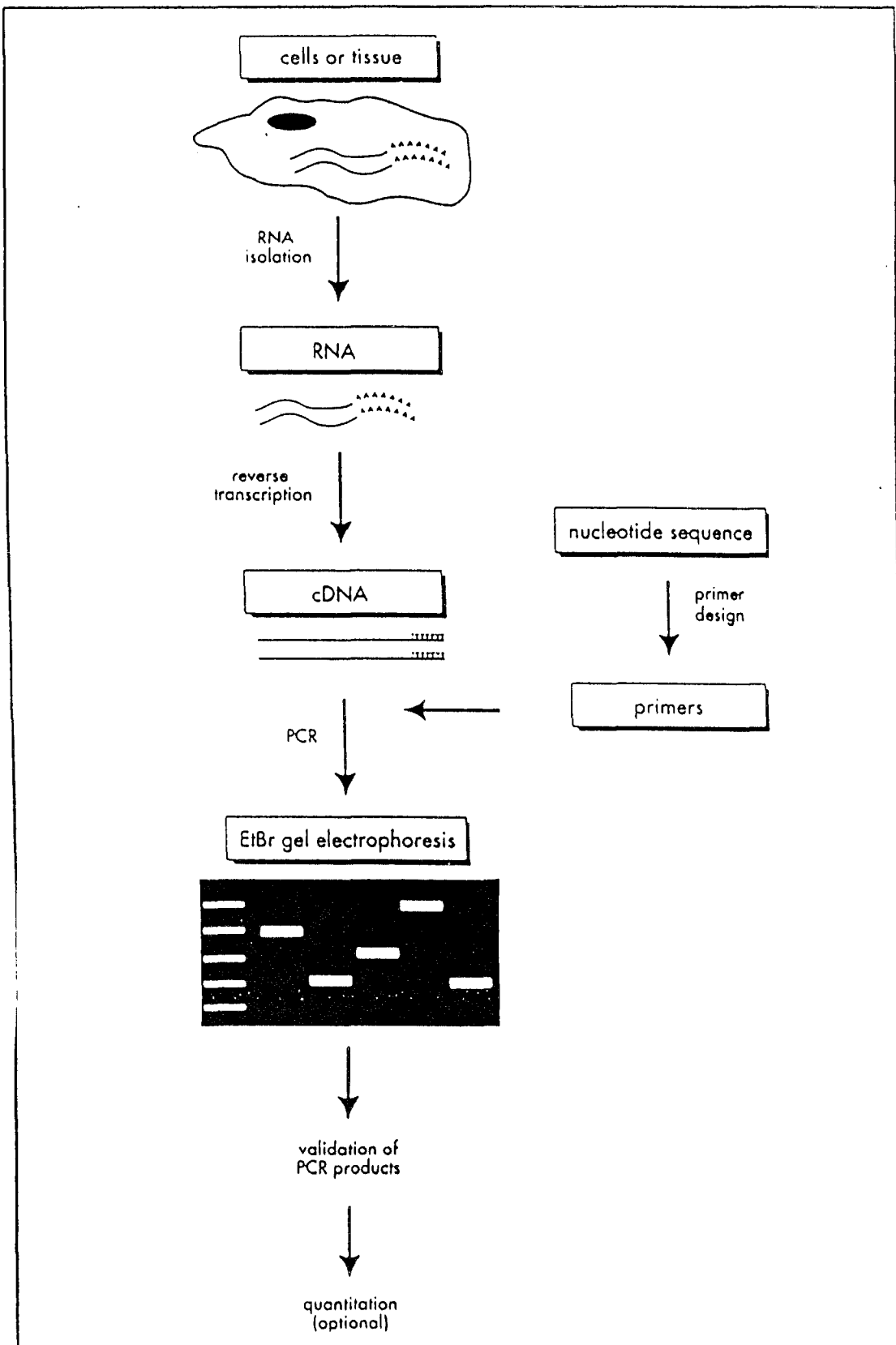


FIGURE 5 : Diagramme schématique de la Méthode RT-PCR.

1 – La reverse transcription :

1.1 Principe :

Des sondes ADN simple brin complémentaires (cDNA) d'échantillons d'ARN messagers peuvent être synthétisées en utilisant des amorces oligo (dT) non spécifiques qui se lient aux séquences polyA trouvées à l'extrémité 3' de la majorité des ARN messagers. (1, 2, 13, 14, 23, 24)

La synthèse du cDNA est catalysée par une enzyme ADN Polymérase ARN dépendante appelée "Reverse Transcriptase" (Cf. Figure 6).

L'Avian Myoblastosis Virus Reverse-Transcriptase" (AMV-RTase) et l'oligo (dT)₁₂₋₁₈ ont été utilisés pour cette synthèse.

L'AMV-RTase possède une activité RNase H qui se traduit par la destruction de l'ARN matrice après transcription en cDNA ; cependant cette enzyme peut entraîner la synthèse d'un cDNA anticomplémentaire utilisant le cDNA produit comme matrice. L'introduction de la "RNase Bloc II Ribonucléase Inhibitor" au cours de la réaction permet de minimiser cet effet négatif des RNases se traduisant par une diminution de rendement de la synthèse. (24)

L'apport d'une quantité définie de [α Phosphore 32 dCTP] permet la quantification du cDNA synthétisé.

1.2 Protocole :

1.2.1 Réactifs :

.Tampon x 10 RTase pour cDNA simple brin (ss cDNA).

{Tris HCl 0,5M pH = 8,3.

{KCl 0,4M.

{MgCl₂ 80mM.

.Pyrophosphate de sodium 0,2M.

.Bétamercaptoéthanol 350mM.

. α (32P) dCTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml.

.RNase Block II Ribonucléase Inhibitor, 1000 U/ml STRATAGENE.

.Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase 21,6 U/ μ l
GENOFIT.

.Phénol équilibré dans Tris HCl pH 7,5 ; 0,1M.

.SEVAG.(Chloroforme : isoamylalcool (24 : 1)).

.dNTP mix :

{dATP 20mM

{dTTP 20mM

{dGTP 20mM

{dCTP 10mM

.NaOH 4N.

.Primer oligo (dT)₁₅ à 1 mg/ml dans H₂O BOEHRINGER.

.Sérumalbumine bovine à 5 mg/ml CLONTECH.

.EDTA 0,5M.

.Colonne Trisacryl GF 05 M, de limite d'exclusion 3000 daltons
(IBF).

1.2.2 Protocole :

-Diluer 8 μ g d'ARN totaux dans 20 μ l H₂O.

-Ajouter 2,5 μ l oligo dT₁₅ à 1 mg/ml.

-Dénaturer 2 minutes à 95° C puis plonger dans la glace.

-Ajouter dans chaque tube :

{1 μ l sérumalbumine bovine à 5 mg/ml,

{0,06 U RNase Block II,

{2 μ l Bétamercaptoéthanol 350mM,

{5 μ l Tampon x 10 RTase,

{2,5 μ l dNTP,

{10 μ l Pyrophosphate de sodium 20mM.

-Incuber 15 minutes dans la glace.

-Ajouter :

{2 μ l dCTP*,

{2,2 μ l AMV-RTase 21,6 U/ μ l,

{qsp 50 μ l H₂O.

- Incuber 50 minutes à 40° C.
- Stopper la réaction par addition de :
 - { 2 μ l EDTA 0,5M,
 - { 4 μ l NaOH 4N.
 afin d'hydrolyser l'ARN restant.
- Incuber 30 minutes à 50° C.
- Neutraliser sur colonne Trisacryl GF 05 M.
- Purifier par addition de :
 - { 90 μ l Phénol, Tris HCl,
 - { 90 μ l SEVAG.
- Centrifuger 5 minutes à 3000 g.
- Récupérer le surnageant et vérifier la neutralité du pH sur bandelette réactive.
- Ajouter 180 μ l SEVAG et centrifuger 5 minutes à 3000 g.
- Récupérer le surnageant ($\approx$ 90 μ l).
- Prélever sur chaque échantillon 5 μ l et compter les cpm CERENKOV sur le compteur à scintillation liquide MINAXI TRI-CARB (PACKARD).
- Conserver le reste de l'échantillon à - 20° C.

1.2.3 Quantification de la synthèse de cDNA (Cf. Annexe 1) : (25)

- 8 μ g ARN totaux qsp 20 μ l H₂O.
- Total des coups : 24,6 10⁶ cpm CERENKOV
(pour 2 μ l α dCTP(³²P) apporté par tube).

TABLEAU DES RESULTATS DE LA SYNTHÈSE DE cDNA

Adénome	cpm de 5 μ l d'éluat	cpm de l'éluat total	$I = \frac{\text{cpm éluat}}{\text{cpm total}}$	Masse de cDNA en μ g	Concentration (ng / μ l) $\frac{\text{masse cDNA}}{\text{Volume d'éluat}}$
1	9990	$1,26 \cdot 10^6$	0,051	1,69	19
2	89173	$1,50 \cdot 10^6$	0,061	2,01	22
3	40045	$0,72 \cdot 10^6$	0,029	0,97	11
4	49710	$0,90 \cdot 10^6$	0,037	1,21	13
5	61933	$1,12 \cdot 10^6$	0,046	1,50	16
6	51399	$1,93 \cdot 10^6$	0,038	1,25	14

Taux d'incorporation $M = I \times 33 \mu\text{g}$

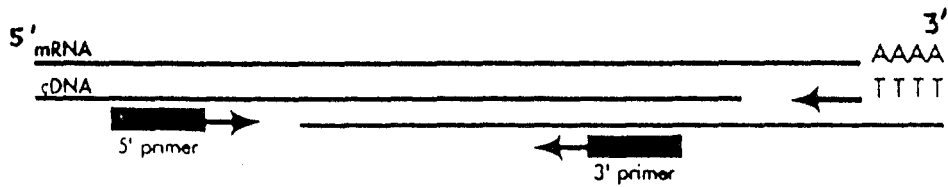


FIGURE 6 : Synthèse de cDNA par la Méthode oligo(dT).

Des oligonucléotides oligo(dT) sont hybridés à la séquence terminale polyA des ARN messagers. Toute la population des ARN messagers sert de support à la synthèse de cDNA.

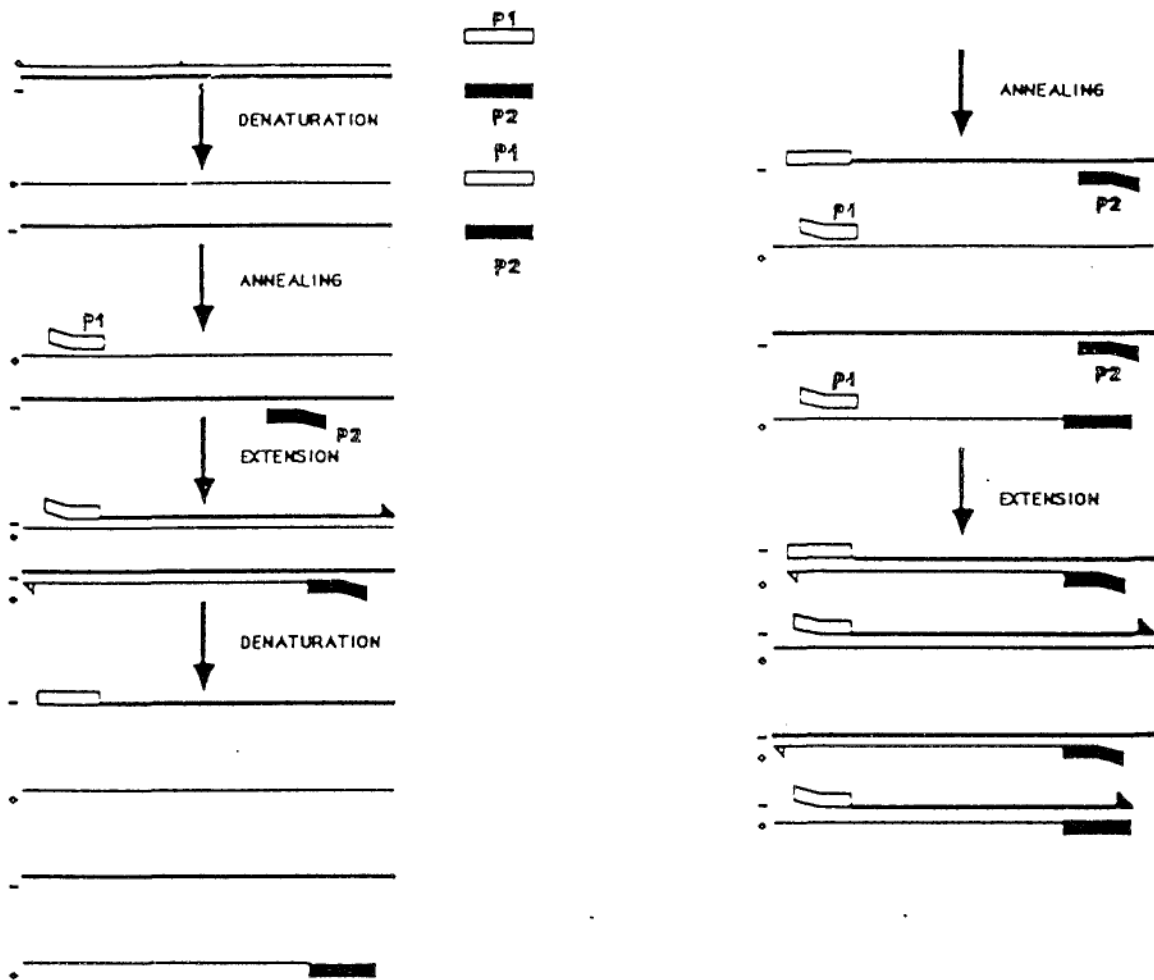


FIGURE 7 : Les 2 premiers cycles d'amplification par Polymerase Chain Reaction.

2 – La " Polymerase Chain Reaction "

2.1 Principe : (cf. Figure 7) (1, 2, 13, 14, 16, 23, 24)

La Polymerase Chain Reaction (= PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement et de manière exponentielle une séquence d'ADN donnée.

Cette technique se prête bien à l'automatisation et des appareils effectuent désormais l'ensemble des opérations pour un grand nombre d'échantillons.

Le principe de la PCR est simple. Il consiste à réaliser in vitro de nombreuses réplifications successives de l'ADN en utilisant comme amorces deux oligonucléotides de synthèse P1 et P2 s'hybridant spécifiquement aux extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier.

P1 est complémentaire du brin $\oplus$ (ou brin codant) de l'ADN et P2 du brin $\ominus$ (ou brin non codant).

Il s'agit d'une réaction cyclique et chaque cycle comprend :

- dénaturation de l'ADN,
- hybridation des amorces P1 et P2,
- synthèse du brin complémentaire par l'enzyme ADN Polymérase.

L'échantillon d'ADN est dans un premier temps dénaturé par la chaleur en présence d'un large excès de concentration des deux amorces et des quatre nucléotides (dNTP).

Puis le mélange réactionnel est refroidi jusqu'à la température critique optimale permettant aux amorces de se lier à leur séquence complémentaire ou " phase d'annealing ". Les cinétiques d'hybridation des amorces sont très favorables par rapport aux cinétiques de renaturation de l'ADN du fait de la forte concentration et de la faible taille de P1 et P2.

L'échantillon est ensuite amené à la température optimale de travail de l'ADN polymérase afin d'étendre les amorces ou " phase d'extension ".

Dès lors, un nouveau cycle identique peut démarrer.

Le produit obtenu majoritairement est un segment d'ADN double brin.

Comme les produits synthétisés lors d'un cycle d'amplification servent de base pour le suivant, chaque cycle successif double le taux d'ADN produit :

$$\text{Rendement théorique} = 2^{(n+1)} \text{ après } n \text{ cycles.}$$

La taille de la séquence amplifiée peut être assez grande (plusieurs kilobases) mais le rendement diminue linéairement avec l'augmentation de la taille ; si bien que si une sensibilité optimale est recherchée, il est préférable de choisir des amorces correspondant à des séquences distantes de seulement cent à quelques centaines de bases.

L'enzyme ADN Polymérase utilisée à l'origine était le fragment de KLENOW de *E.coli* ADN Polymérase I mais elle était inactivée aux températures requises pour dénaturer l'ADN, d'où la nécessité d'en rajouter à chaque cycle d'extension.

Ce problème a été résolu avec l'introduction d'ADN Polymérases thermostables, Taq Polymérase (extraite de *Thermus aquaticus* trouvé dans les sources chaudes du Yellowstone National Park), présentant une activité d'élongation optimale entre 75 et 80° C, puis d'autres plus résistantes encore aux hautes températures. Nous avons utilisé ici la VentTM DNA Polymérase (obtenu à partir de *Thermococcus litoralis*, une bactérie qui pousse dans les fosses sous-marines volcaniques). Cette enzyme possède une excellente fidélité et peut étendre un primer jusqu'à 10 – 13 Kbases. (10)

2.2 Choix et méthode d'extension des amorces :

Le choix de nos amorces P1 et P2 a été réalisé à partir de la publication de COOKE qui donne les séquences en bases et acides aminés correspondantes des ARN messagers de hPRL et hGH (Cf Annexe 2). (4)

Des séquences riches en (G+C) et hétérologues par rapport au reste de l'ARN messager sont choisies de préférence. Leur taille doit être supérieure à 16 nucléotides, de préférence 20 à 24 (problème de spécificité). (21, 24)

La synthèse a été réalisée par le laboratoire GENSET qui utilise des automates pilotés par microprocesseur. En pratique, il suffit de charger les réservoirs de l'appareil avec des réactifs appropriés, de rentrer la séquence désirée et de récupérer en sortie l'oligonucléotide synthétisé. La voie de synthèse choisie pour ces appareils est celle des phosphoramidites. (21) (Cf Figure 8).

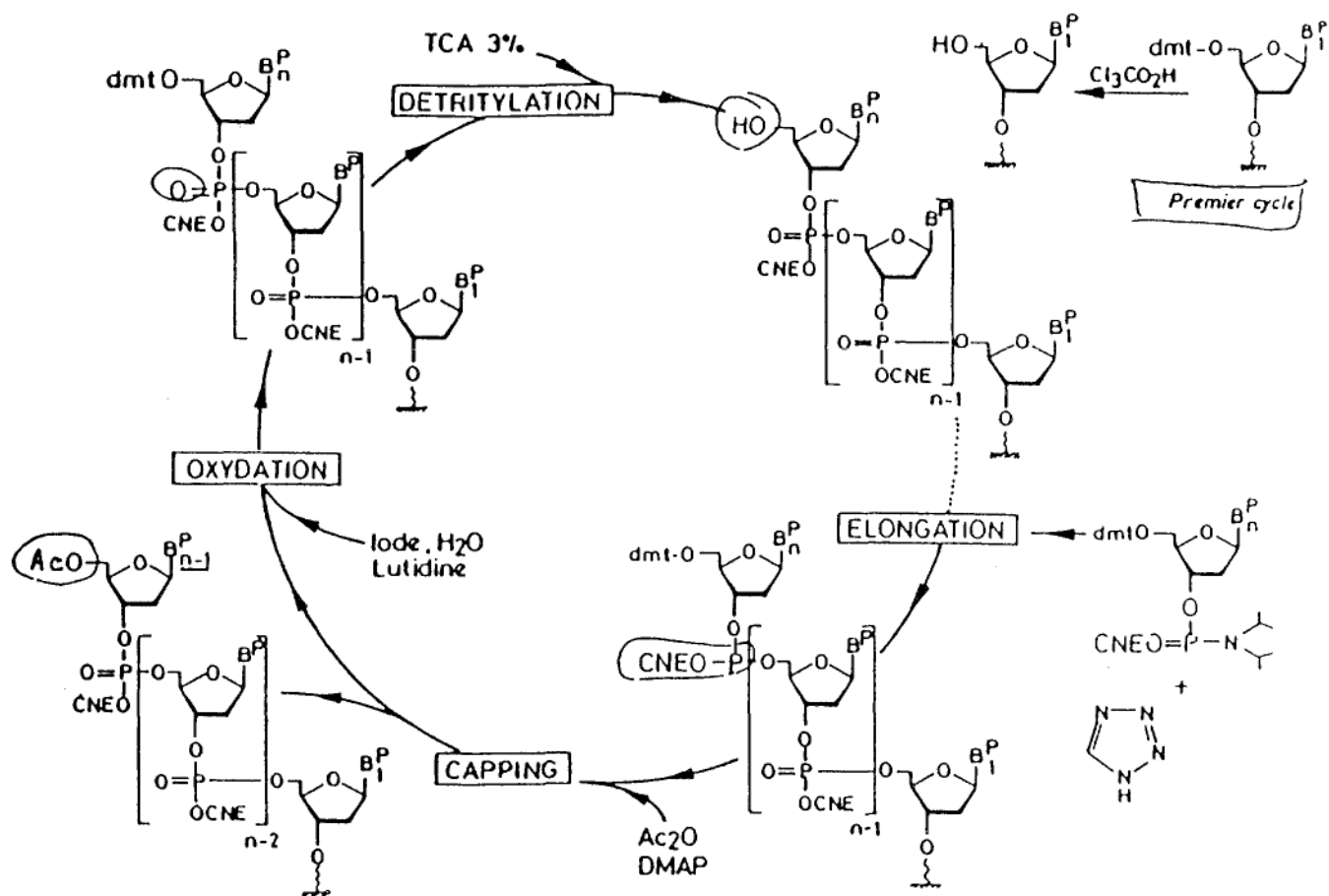


FIGURE 8 : Le cycle de condensation phosphoramidite.

Bien que les appareils actuels permettent de fabriquer des oligonucléotides de 100 à 120 bases, il n'est cependant pas conseillé de dépasser les 40 – 50 bases afin d'éviter une diminution du rendement de synthèse.

Ainsi obtenu, l'oligonucléotide doit être purifié pour éliminer les produits de réaction ayant avorté. Cette purification est réalisée soit par électrophorèse préparative en gel d'acrylamide, soit par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse ou en échange d'ions. Des microcolonnes manuelles spécifiques sont maintenant commercialisées.

2.3 Protocole :

2.3.1 Réactifs :

.Tampon x 1 pour enzyme DNA Polymérase

{KCl 10mM

{(NH₄)₂SO₄ 10mM

{Tris HCl 20mM ; pH 8,8

{MgSO₄ (concentration de 2mM,4mM,6mM,8mM MgSO₄)

{Triton X – 100/O,1 %

.MgSO₄, 7H₂O ; 1M

.Sérumalbumine Bovine acétylée à 100 µg/ml

.dNTP 10mM

.Amorces :

	P1	P2	Fragment amplifié
hPRL	(105-111) 21 mer Td=68 °C.	(10-16) 21 mer Td=68 °C.	306 pb
hGH	(136-142) 20 mer Td=62 °C.	(-1/+6) 20 mer Td=62 °C.	428 pb

.Vent™ DNA Polymérase à 10/µl BIOLABS

.Huile minérale

La concentration en Mg^{2+} affecte différentes variables de la réaction de PCR : (24)

- le primer annealing
- la température de dissociation
- la spécificité du produit d'amplification
- l'activité de l'enzyme ADN polymérase.

Dans ce but, des concentrations croissantes ont été essayées afin d'obtenir le résultat optimal.

2.3.2 Protocole : 1 série pour hPRL, 1 Série pour hGH

. Ajouter dans l'ordre dans chaque tube :

- {H₂O qsp 50 μ l $\rightarrow$ 28,5 μ l
- {5 μ l Tampon x 1
- {0,5 μ l Sérumalbumine bovine acétylée
- {dNTP 10mM chacun
- {10 μ l échantillon cDNA
- {Primer P1 100pM } correspondant à chacune
- {Primer P2 100pM } des 2 séquences

. Ajouter ensuite 1 U de VentTM DNA Polymérase
(1 U pour 50 μ l réactionnel).

Il s'agit d'une concentration moyenne dans la zone possible
(0,5 à 5 U/100 μ l).

. Couvrir l'échantillon d'une couche d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

. Mettre en route l'automate de PCR selon les conditions suivantes :

	hGH	hPRL
Dénaturation	97° C / 10 s	96° C / 10 s
Annealing	53° C / 30 s	57° C / 30 s
Extension	73° C / 30 s	73° C / 30 s

Ces conditions sont enregistrées dans un programme de l'automate.

Le cycle est répété 30 fois (durant la nuit).

L'automate de PCR utilisé (le THERMAL REACTOR de HYBAID, CERA-LABO) est un bloc chauffant, refroidissant, destiné à réguler la température de 1 jusqu'à 54 tubes de 0,5 ml, format EPPENDORF (il remplace très avantageusement la technique manuelle du bain-marie).

Les échantillons peuvent y être maintenus à température constante, chauffés rapidement, ou refroidis, à des températures et temps différents.

Alternativement les échantillons peuvent y être soumis à des cycles thermiques.
(Cf. Annexe 4).

L'avantage du procédé HYBAID est de pouvoir contrôler et réguler le déroulement d'un programme par un thermocouple placé dans un tube témoin.

2.4 Contrôle du produit d'amplification par électrophorèse en minigel d'agarose (24)

Nous avons fait varier la concentration en MgSO₄ lors de la PCR. Ainsi, nous avons réalisé 4 réactions de PCR avec des concentrations en MgSO₄ de 2mM, 4mM, 6mM, 8mM.

De ce fait nous avons réalisé plusieurs gels d'électrophorèse. Seule la concentration de 2mM MgSO₄ a donné des résultats pour hPRL donc seul ce résultat est présenté.

2.4.1 Première série :

Nous avons ici testé hPRL avec concentration en MgSO_4 de 2mM et hGH avec cette même concentration en MgSO_4 .

.Préparer 40 ml de gel à 1,6 % :

{Agarose KILOROSE CLONTECH

{TBE x 1

{Bet à 1 mg/ml

.Poids moléculaires marqués :

PM1 = λ Hind III + Eco R1 BOEHRINGER

PM2 = ϕ X 174 / Hae-III CLONTECH

.Dépôt :

8 μl de produit PCR

2 μl de tampon de charge :

{0,25 % Bleu de Bromophénol

{0,25 % Xylène Glycol

{30 % Glycérol

PUITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DEPOT	PM1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O	PM2	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O

.Résultats de la migration :

Nous remarquons l'absence de bandes pour les puits de 1 à 9 = ni le poids moléculaire 1, ni la présence éventuelle de hGH ne sont révélées.

Par contre le poids moléculaire 2 peut être observé sur l'électrophorèse et nous remarquons la présence de bandes caractéristiques de hPRL pour les adénomes 2, 3, et 4.

Voir Page 52

2.4.2 Deuxième série :

Ici nous avons testé des concentrations en MgSO_4 de 4mM, 6mM et 8mM pour hGH et 2mM pour hPRL.

Les conditions de l'électrophorèse sont les mêmes pour les 2 gels réalisés.

***1er gel :**

hGH avec 4mM MgSO_4

hGH avec 6mM MgSO_4 ,

PUITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DEPOT	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O	PM2	A1	A2	A3	A4	A5	A5	H2O	PM1

L'électrophorèse nous révèle la présence de hGH pour les adénomes 3, 4, et 6, caractérisée par les bandes correspondantes.

***2ème gel :**

hGH avec 8mM MgSO_4

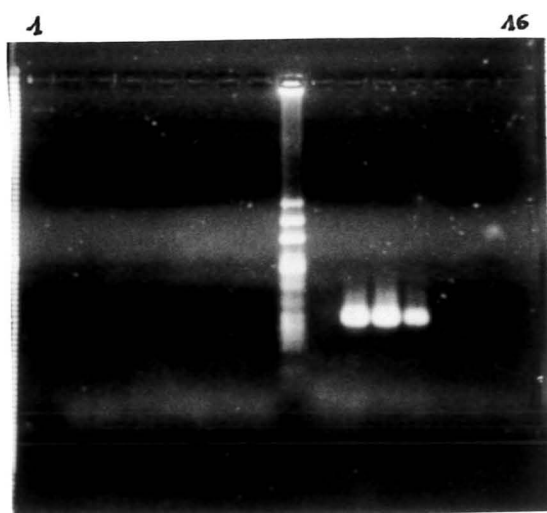
hPRL avec 2mM MgSO_4 ,

PUITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DEPOT	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O	PM2	A1	A2	A3	A4	A5	A5	H2O	PM1

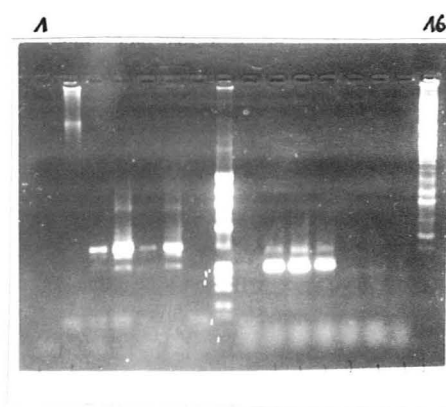
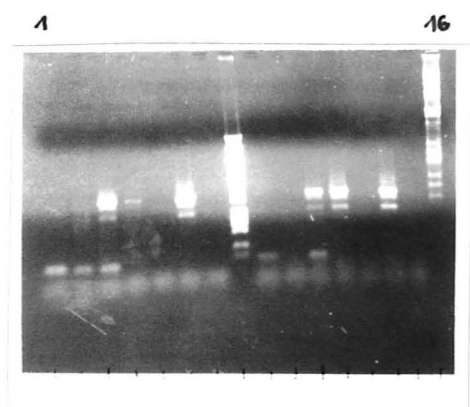
Nous pouvons confirmer la présence de hPRL pour les adénomes 2, 3 et 4 et de hGH pour les adénomes 3, 4 et 6.

Cependant, une bande correspondant à hGH est révélée pour l'adénome 5, non observée pour des concentrations plus faibles en MgSO_4 .

Voir Page 52.



PREMIERE SERIE



DEUXIEME SERIE

PHOTOGRAPHIES DES MINIGELS D'AGAROSE DE CONTROLE
DES PRODUITS D'AMPLIFICATION PCR.

2.5 Validation du produit d'amplification par hybridation par sondes oligonucléotidiques marquées au Phosphore 32 : technique du SOUTHERN-BLOT.

2.5.1 Principe :

La technique de blotting adaptée aux ADN a été mise au point par E.M. SOUTHERN. Le NORTHERN-BLOT précédemment détaillé est une application de cette méthode aux ARN. (2, 24, 26)

Nous avons réalisé le transfert par capillarité sur une membrane de Nylon activé et dans un tampon adapté des fragments d'ADN qui ont migré dans un gel d'agarose.

Après fixation des fragments d'ADN sur la membrane, l'hybridation est réalisée par action de sondes oligonucléotidiques marquées au Phosphore 32 spécifiques des séquences d'ADN étudiées.

La révélation se fait par autoradiographie.

Nous avons utilisé deux sondes spécifiques pour chaque fragment d'ADN : (18, 19, 22)

hGH = hGH (11-17) selon la publication de LLOYD ;
hGH (88-95) selon recherche personnelle ;

hPRL = hPRL (66-72) selon la publication de LLOYD ;
hPRL (57-64) selon recherche personnelle.

Ces sondes ont été fabriquées par le Laboratoire GENSET sur demande.

2.5.2 Protocole :

.Electrophorèse en gel d'agarose à 2 %

-réaliser un grand gel d'agarose (140ml) :
{2,8 g. Agarose Kilorose CLONTECH,
{140 ml TBE x 1,
{70 µl Bet à 1 mg/ml.

-dépôts :

PM = ϕ x 174 RF/Hac III marqué au Phosphore 32.

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Dépôt	PM	-	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O	-	-	A1	A2	A3	A4	A5	A6	H2O	-	PM

Pour la série de puits de 3 à 8 : on a utilisé le produit d'amplification PCR en GH avec une concentration en MgSO₄ de 8mM.

Pour la série de puits de 12 à 17 : on a utilisé le produit d'amplification PCR en PRL avec une concentration en MgSO₄ de 2mM.

-Migration : 2 h à 50 V.

-Vérification de la migration sous UV (grâce au Bet).

Voir Page 55.

Transfert sur membrane de Nylon activé BOEHRINGER pendant la nuit en SSC x 20 (1 membrane pour chaque série GH et PRL, selon le même principe que le NORTHERN-BLOT).

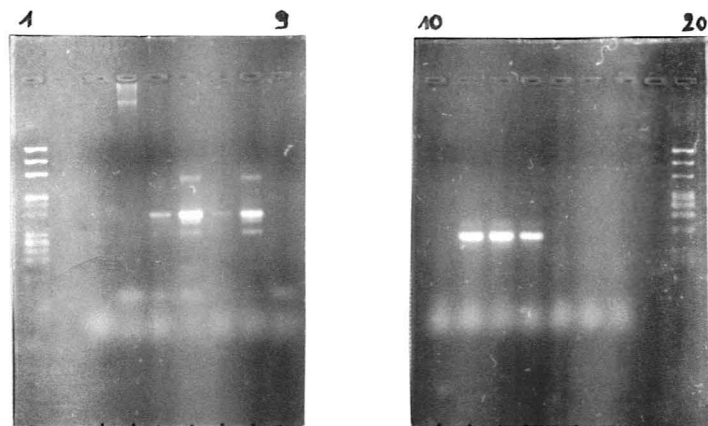
Fixation de la membrane en NaOH 0,05 N pendant 5 minutes puis neutralisation dans SSC x 2 pendant 10 minutes.

Hybridation sur produit PCR avec les sondes :

hGH (11-17)

hPRL (66-72).

les sondes oligonucléotidiques sont marquées au Phosphore 32 en 5' terminal selon le protocole précédemment détaillé. (9, 11)



PHOTOGRAPHIE DU GEL D'AGAROSE DE L'ELECTROPHORESE DU
SOUTHERN-BLOT.

- préhybridation (en sac) :

{12 ml tampon {SSPE x 5

{DENHART x 10

{SDS 1 %

{300 μ l ADN hétérologue.

Bain-marie à 42° C pendant 3 heures, sous agitation.

- hybridation pendant la nuit sous agitation à la température optimale de la sonde utilisée :

{1,5 ml tampon {SSPE x 5

{Denhardt x 10

{SDS 1 %

{38 μ l DNA hétérologue

{Sonde hGH ou hPRL selon la membrane

- lavage {SSPE x 2
 {SDS 0,5 %

{SDS 0,5 %

rinçage dans 100 ml

lavage au bain-marie à 42° C pendant 5 minutes, sous agitation.

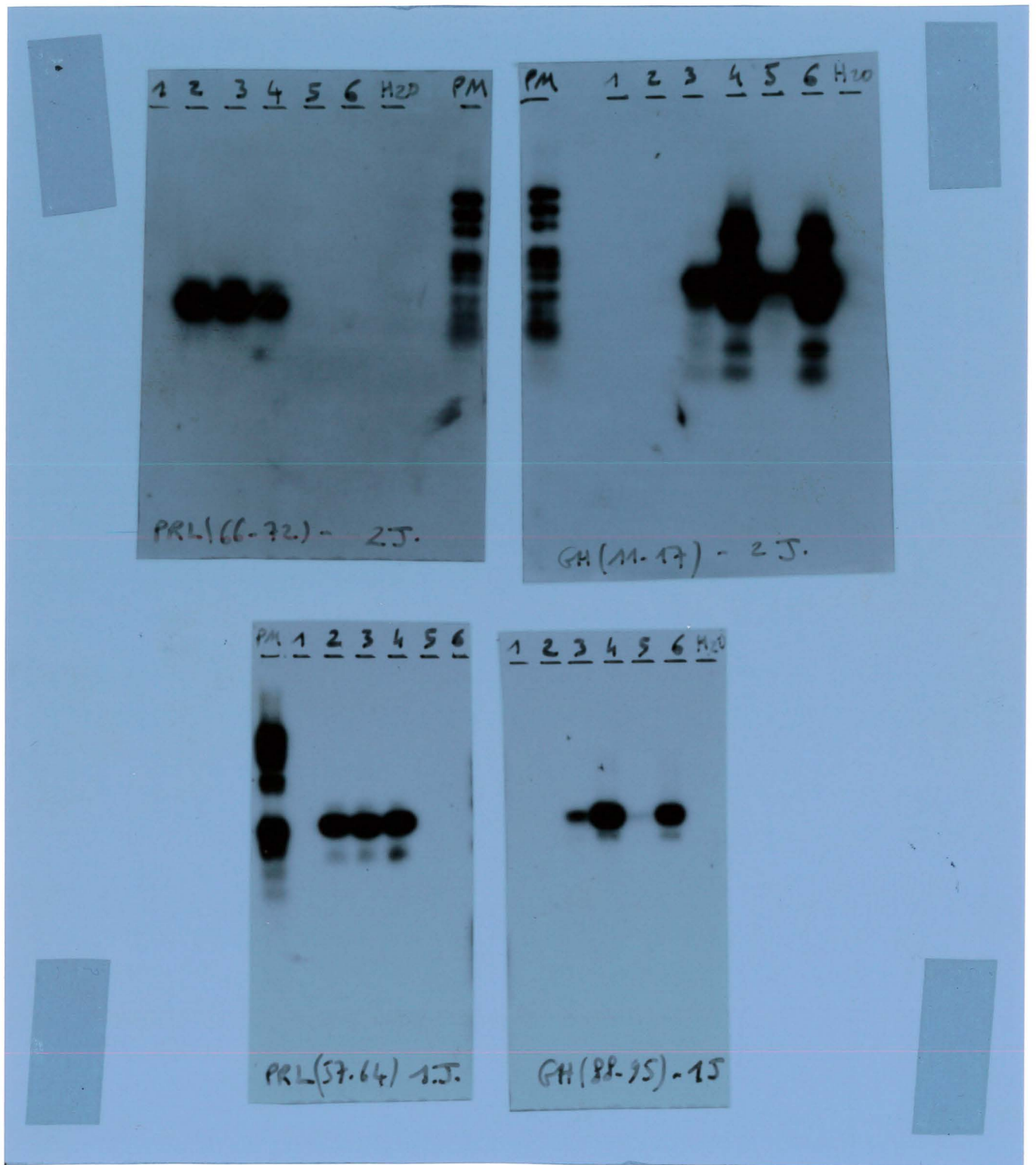
- autoradiographie.

Le même protocole est suivi en utilisant cette fois-ci les sondes hGH (88-95) et hPRL (57-64).

2.5.3 Résultats

Après une exposition de durée convenable, la révélation des autoradiographies donne des résultats cohérents avec les études précédentes, c'est-à-dire confirmation de la positivité en hGH des adénomes 3, 4, 5 et 6 et en hPRL des adénomes 2, 3 et 4.

La grande spécificité des sondes oligonucléotidiques choisies pour cette étude permet une validation des travaux effectués et confirme la très haute sensibilité de la technique PCR.



REVELATION AUTORADIOGRAPHIQUE DU SOUTHERN-BLOT.

IV – TABLEAU RECAPITULATIF

ADENOME HYPOPHYSAIRE	COUPE IMMUNO- HISTOCHIMIQUE	NORTHERN – BLOT			RT – PCR SOUTHERN – BLOT	
		GH	PRL	28 S	GH	PRL
A1	non immunoréactif	–	–	++	–	–
A2	GH – PRL +	–	+	++	–	+++
A3	GH – PRL +	±	++	+++	+	+++
A4	GH + PRL +	++	±	+++	+++	+++
A5	GH + PRL –	–	–	++	±	–
A6	GH + PRL –	+++	–	+++	+++	–

Les résultats mettent en évidence la grande sensibilité de la RT – PCR par rapport au NORTHERN – BLOT.

Une discordance est visible entre les résultats obtenus par NORTHERN – BLOT ou RT-PCR (méthodes basées sur l'expression génique) et ceux d'immunohistochimie (basés sur la traduction en protéine) : cas de l'adénome A3.

L'absence de témoins normaux traités en parallèle aux échantillons s'explique de deux façons :

- Obtention d'un tissu hypophysaire humain normal pratiquement impossible (intervention transphénoïdale sur un coma dépassé très difficile à mettre en oeuvre , durée de vie des ARN messagers très brève interdisant la possibilité de prélèvement post-mortem).
- Utilisation de fragments tissulaires juxtaadénomateux non rigoureuse en qualité de témoin car les lignées cellulaires y sont en état de freination par rapport à l'adénome .

Nous faisons donc référence aux travaux de Ricardo V.LLOYD, dont les recherches sur les ARN messagers hypophysaires sont très poussées.

CONCLUSION

La RT – PCR offre l'avantage d'une grande sensibilité grâce au phénomène d'amplification et à sa rapidité de réalisation.

La confrontation des résultats qualitatifs avec ceux obtenus par les méthodes immunohistochimiques en permet la validation.

En effet, il y a concordance pour cinq des adénomes. De plus, dans le cas de l'adénome 3, le phénomène d'amplification par PCR a permis de le positiver en GH.

En comparaison avec le NORTHERN – BLOT, la PCR donne des résultats plus nets.

L'application d'une technique RT – PCR à la recherche des ARN messagers de la prolactine et de l'hormone de croissance se révèle donc particulièrement bien adaptée au diagnostic et à la caractérisation des adénomes hypophysaires.

Les choix d'utilisation de cette méthode sont très vastes, autant dans le domaine de la biologie moléculaire que dans celui du diagnostic médical.

Récemment une technique combinant hybridation in situ et PCR a été mise au point, l'amplification étant effectuée directement sur les coupes cellulaires. Ce serait une excellente alternative aux deux méthodes combinées d'immunohistochimie et de RT-PCR. Ainsi, les chercheurs disposeraient d'outils de diagnostic d'une sensibilité jamais atteinte, tout en offrant une très haute fiabilité (1).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 – **ALLARD Patrick** : L'innovation permanente – in BIOFUTUR N° 118 – 1992, 26–31.
- 2 – **BERGER S.L., KIMMEL A.R.** : GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Methods in Enzymology, Vol. 152, 1987, Academic Press.
- 3 – **CHOMCZYNSKI P., SACCHI N.** : Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, Analytical Biochemistry – 162, 1987, 156–159.
- 4 – **COOKE N.E., COIT D., SHINE J., BAXTER J.D., MARTIAL J.A.** : Human Prolactin, cDNA Structural Analysis and Evolutionary Comparisons, The Journal of Biological Chemistry, Vol 256 N° 8, 1981, 4007–4016.
- 5 – **CREPIN M.** : EXPRESSION DES GENES ET GENIE GENETIQUE, 1987, Editions HERMANN.
- 6 – **DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D.** : LA CELLULE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, 1988, Edition VIGOT.
- 7 – **DE NOTO F.M., MOORE D.D., GOODMAN H.M.** : Human Growth Hormone DNA sequence and mRNA structure : possible alternative splicing, Nucleic Acid Research Vol. 9 N° 15, 1981, 3719–3730.
- 8 – ENDOCRINOLOGIE, Maladies métaboliques – Concours Interrégional de l'Internat.
- 9 – **FOUQUE B.** : Sondes à acides nucléiques, marquage radioactif – Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, CEA – Ministère de l'Education Nationale – 1989.
- 10 – **GELFAND D.H.** : Taq DNA Polymerase – PCR Technology, 1989, 17–22, HAERLICH Edition, Stockton Press New-York.
- 11 – **GUESDON J.L.** : Principe de l'utilisation des sondes nucléiques, Ann-Biochim Clin-Qué., 28 (1), 1989, 4–10.

- 12 – **HAZARD J., PERLEMUTER L.** : Abrégés Endocrinologie 3ème Edition, 43–109, Editions MASSON.
- 13 – **INNIS M.A., GUELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J.** : PCR–PROTOCOLS, A guide to methods and applications, 1990, Academic Press.
- 14 – **KAHN A.** : L'amplification in vitro des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) : un tournant en génétique, Médecine Sciences, 8, 1988, 515–518.
- 15 – **KAPLAN J.L., DELPECH M.** : Biologie moléculaire et médecine, 1989, Médecine–Sciences – FLAMMARION.
- 16 – **LARZUL D.** : La PCR : principes et applications – Immuno anal. Biol. Spéc., 16, 1989, 19–28.
- 17 – **LEWIN B.** : GENES, 1988, Médecine–Sciences–Flammarion.
- 18 – **LLOYD R.V., CANO M., CHANDLER W.F., CHANDLER W.F., BARKAN A.L., HORVATH E., KOVACS K.** : Human Growth Hormone and Prolactin Secreting Pituitary Adenomas Analyzed by *In Situ* Hybridization, American Journal of Pathology, Vol 134 N° 3, 1989, 605–613.
- 19 – **LLOYD R.V., FIELDS K., JIN L., HORVATH E., KOVACS K.** : Analysis of Endocrine Active and Clinically Silent Corticotropic Adenomas by *In Situ* Hybridization. American Journal of Pathology, Vol. 137 N° 2, 1990, 479–488.
- 20 – **Mc NICOL A.M., WALKER E., FARQUHARSON M.A., TEASDALE G.M.** : Pituitary macroadenomas associated with hyperprolactinaemia immunocytochemical and In Situ hybridization studies. Clinical Endocrinology, 35, 1991, 239–244.
- 21 – **MOLKO D.** : Sondes à acides nucléiques : synthèse chimique d'oligonucléotides. Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, CEA Ministère de l'Education Nationale, 1989.
- 22 – **ROSKAM W.G., ROUGEON F.** : Molecular cloning and nucleotide sequence of the human Growth Hormone structural gene, Nucleic Acids Research, Vol 7 N° 2, 1979, 305–320.

- 23 – RT-PCR – Methods and Application Book 1, CLONTECH, Clontech Laboratories, Inc, 1991.
- 24 – SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. : Molecular Cloning : A laboratory Manual – Second Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 25 – SIMONNET G. ORIA M. : Les mesures de radioactivité à l'aide des compteurs à scintillation liquide, 1986, Editions EYROLLES 2ème édition.
- 26 – SOUTHERN E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol-Biol., 98, 1975, 503–517.
- 27 – TAKAHASHI H., NABESHIMA Y., NABESHIMA Y.I., OGATA K., TAKEUCHI S. : Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of DNA Complementary to Human Decidual Prolactin mRNA, J. Biochem, 95, 1984, 1491–1499.

—:—:—:—:—:—:—:—:—:—

ANNEXES

ANNEXE 1

MESURE DE LA RADIOACTIVITE DES EMETTEURS BETA⁻ PAR EFFET CERENKOV.

Il est possible d'utiliser les compteurs à scintillation liquide pour mesurer les radioactivités des émetteurs B⁻ de fortes énergies en mettant à profit un autre phénomène de création de lumière : l'effet Cerenkov qui se produit dans tout milieu liquide. Cela permet de s'affranchir de la nécessité d'utiliser les solutions scintillantes.

Si le radioisotope est dissous dans de l'eau l'énergie minimale est théoriquement de 0,25 MeV, cependant on obtient une efficacité de détection suffisante seulement lorsque l'émetteur B⁻ a une énergie maximale d'environ 0,7 MeV.

Conditions de mesure :

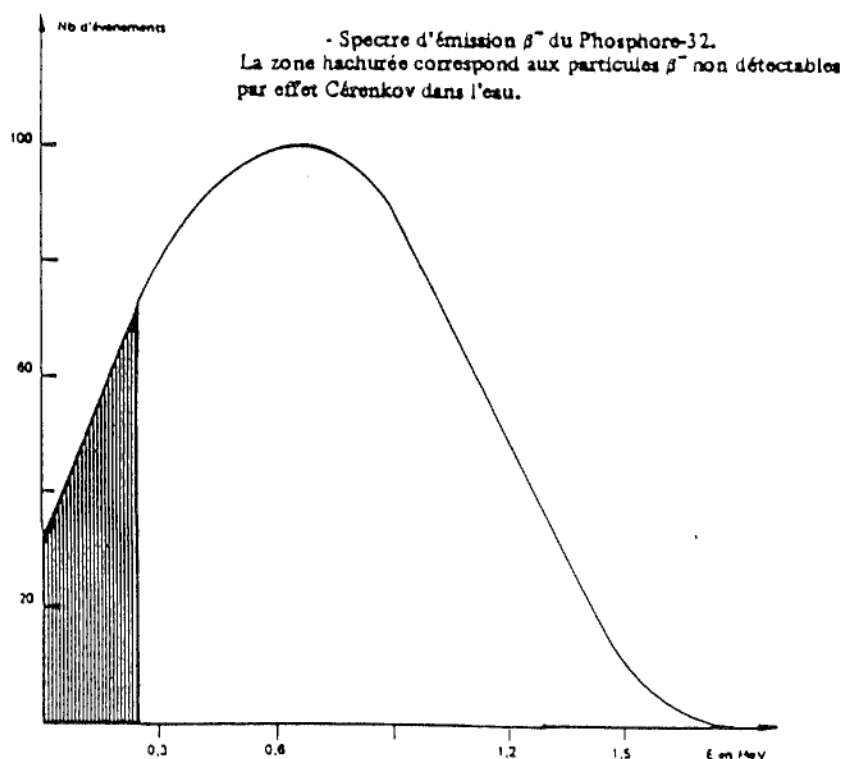
Le réglage des voies de mesure peut être réalisé manuellement.

S'il y a des voies préréglées par le constructeur, on peut mesurer le Phosphore 32 par effet Cerenkov dans la voie correspondant au Tritium.

Intérêt par rapport à la scintillation liquide :

- mouvement propre 2 à 4 fois plus faible, surtout en utilisant des fioles plastiques
- pas de phénomène d'autoabsorption
- comptage dans tout l'espace
- pas de préparation des échantillons
- pas de quenching chimique.

Pour le Phosphore 32 d'énergie B⁻max = 1,71 MeV, l'efficacité de détection est de 43 % .

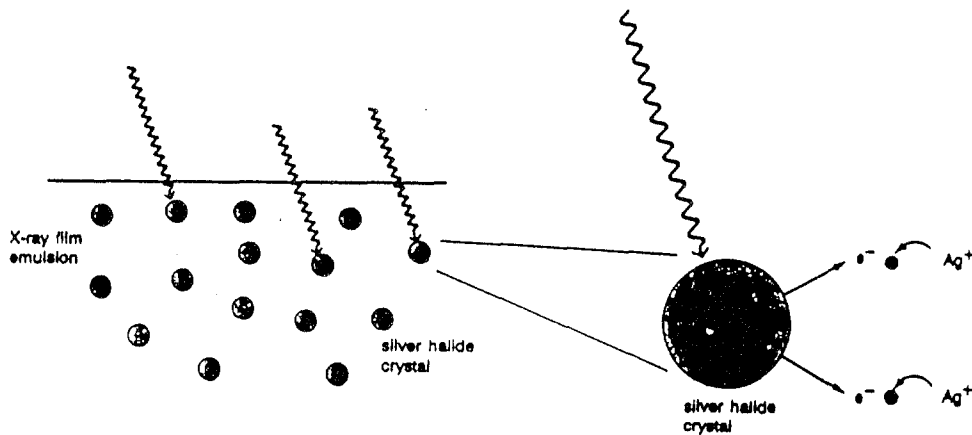


ANNEXE 3

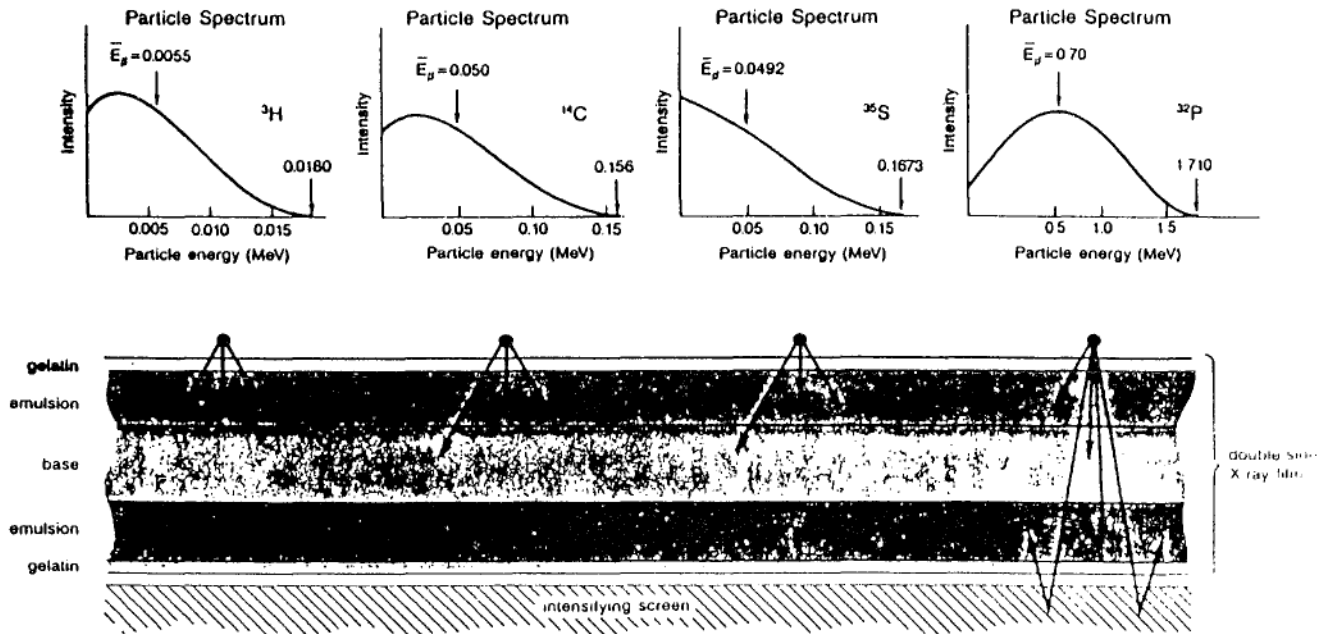
AUTORADIOGRAPHIE

Autoradiography produces permanent images on photographic film of the distribution of radioactive atoms on a two-dimensional surface. In molecular cloning, autoradiography is used for a variety of purposes, including the visualization of bands of radioactive nucleic acids in Southern and northern hybridizations, the identification of bacterial colonies or bacteriophage plaques that hybridize to radioactive probes, and the localization of bands of DNA in gels (e.g., in DNA sequencing). A diagram of the events that occur during exposure of photographic emulsion to radioactivity is shown in Figure E.2.

The two isotopes most commonly used for autoradiography are ^{35}S and ^{32}P , both of which emit β particles. However, the energies of these particles are very different: ^{35}S emits a particle with a maximum energy of 0.167 MeV that can penetrate film emulsion only to a depth of 0.25 mm (see Figure E.3). Although this is sufficient to allow the emitted β particles to interact productively with silver halide crystals in the emulsion, it is not enough to allow the particles to pass through barriers (e.g., Saran Wrap) that might be placed between the film and the source of the radiation. Thus, when establishing autoradiographs of ^{35}S -labeled material, it is essential that the film and the source of the radiation be directly apposed to one another. Gels should be as thin as possible and should be fixed and dried before autoradiographs are taken (see Chapter 6, page 6.45). Nitrocellulose filters and nylon membranes should be thoroughly dried, and care should be taken to ensure that the surface carrying the radioactivity is placed in contact with the film. (Note: Damp gels and membranes stick tightly to the film and usually cannot be removed).



Events leading to the formation of an autoradiographic image. The diagram shows that particles entering autoradiographic film cause ejection of electrons from silver halide crystals. These electrons attract positively charged silver ions, generating precipitates of silver atoms.



Energy of radiation emitted by commonly used isotopes. The graphs in the upper part of the figure show the spectra of energies carried by particles emitted by decaying radioactive isotopes. In each case, the arrow marks the average energy per particle. The diagram in the lower part of the figure shows the depth to which commonly used isotopes penetrate autoradiographic film.

ANNEXE 4

INTRODUCTION AU PROGRAMME D'UTILISATION DE L'APPAREIL POUR PCR "HYBAID THERMAL REACTOR" DE CERA-LABO.

INTRODUCTION

Le Thermal Reactor de HYBAID est un bloc chauffant refroidissant, destiné à réguler la température de jusqu'à 54 tubes de 0,5 ml, format Eppendorf.

Les échantillons peuvent y être maintenus à température constante, ou chauffés rapidement, ou refroidis, à des températures et temps différents.

Alternativement, les échantillons peuvent y être soumis à des cycles thermiques.

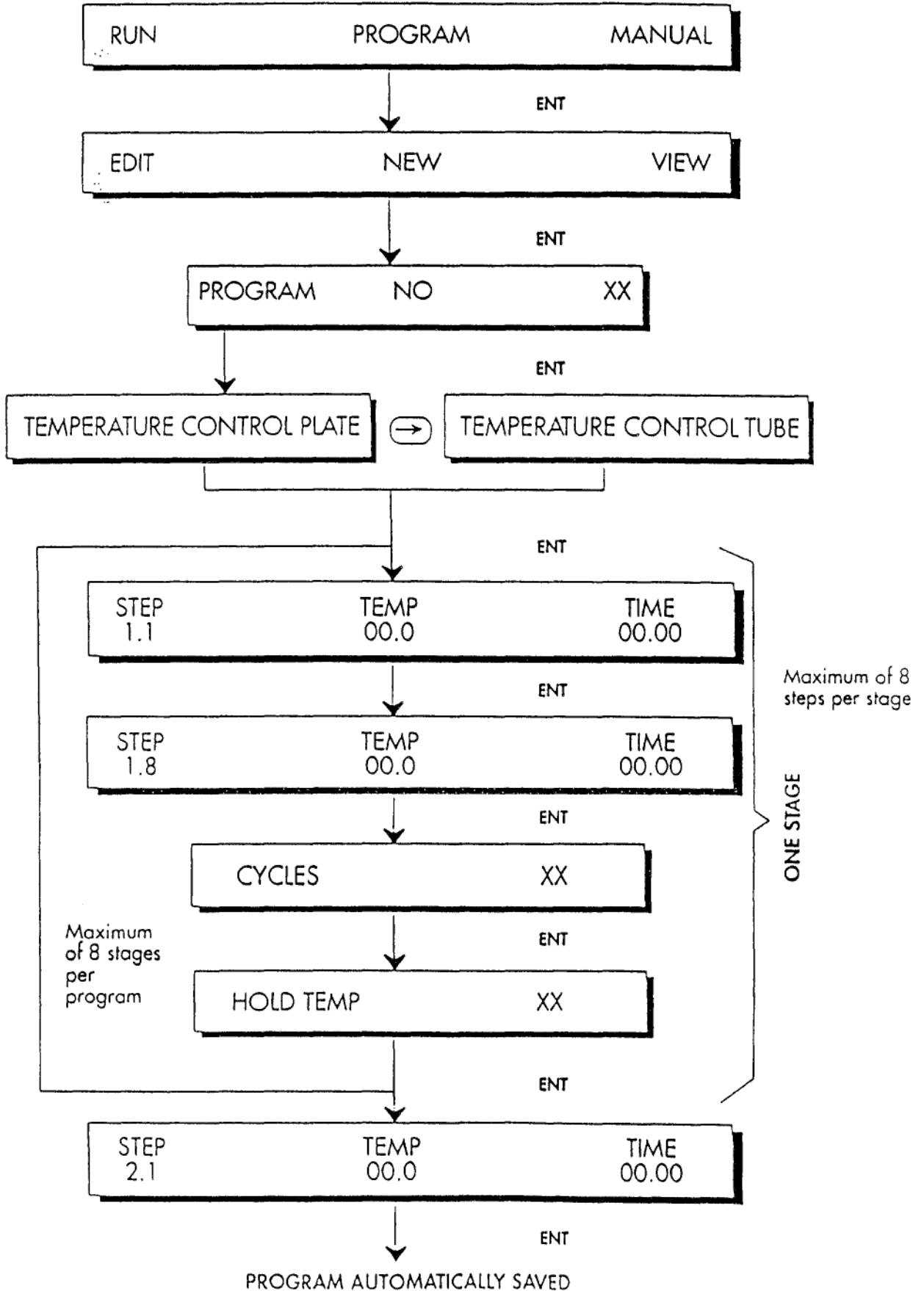
Il est alimenté par un réseau standard 220-240 V, 50 Hz.

Il est commandé par un clavier digital qui agit sur un menu standard, visualisé sur un affichage à cristaux liquides.

IMPORTANT : La garantie sur nos appareils et produits s'applique uniquement au changement des pièces reconnues défectueuses, seulement en cas d'utilisation conforme au mode d'emploi. La garantie ne couvre pas les dommages corporels ou matériels résultant du bon ou mauvais usage des ces produits ou appareil. L'utilisation des appareils ou produits pour des usages ou procédés couverts par des brevets est sous la seule responsabilité de l'utilisateur.

The Hybaid Thermal Reactor

Programmed Operation



**PASSAGE D'UNE TECHNIQUE MANUELLE EN BAINS-MARIE
(OU AUTOMATISEE SUR UN AUTRE APPAREIL COMMANDE PAR
THERMOCOUPLE DE PLATEAU) A UNE TECHNIQUE AUTOMATISEE
A L'AIDE DU THERMAL REACTOR HYBAID**

L'avantage unique au monde du procédé HYBAID de pouvoir contrôler et réguler le déroulement d'un programme par un thermocouple placé dans un tube témoin fait dans la plupart des cas que vous avez intérêt à utiliser ce thermocouple pour réguler l'appareil plutôt que celui de plateau. En effet, il vous permettra de voir, contrôler et soumettre directement vos produits réactifs aux températures et durées nécessaires sans risque de surchauffes, pertes de temps, donc d'activité ...

Le contrôle par le thermocouple de plateau vous permettra par contre de soumettre vos produits aux mêmes conditions qu'un bloc chauffant ordinaire.

Ce thermocouple de plateau permet de plus, lorsque c'est lui qui régule l'appareil, de se servir alors du couple extérieur comme appareil de mesure très précis de la température.

Pour reproduire une manipulation en bain-marie (ou en autre bloc), il faut en déterminer avec précision les paramètres, en fait les températures de palier et les durées de ces paliers auxquels sont soumis les produits.

Pour cela, branchez le thermocouple de tube externe long réf HBTR ET 100, puis mettez le Thermal Reactor sous tension. Mettre le Thermal Reactor en manuel, à température constante de 30°C (pour moins de 25°C d'ambiante). Introduire le contrôle par le thermocouple de plateau. Attendre la stabilisation une dizaine de minutes.

Vérifiez que le tube témoin contenant le thermocouple externe soit bien rempli d'un volume d'huile de paraffine égal à celui : volume réactionnel + huile de recouvrement.

Munissez-vous d'un chronomètre et faites-vous assister pour noter les résultats.

Pressez la flèche droite, vous verrez s'afficher la température du tube témoin.

Les manipulations de cyclages thermiques se font en général avec trois bains-marie.

Effectuez alors avec le tube témoin (en le plaçant éventuellement dans le rack où vous mettez vos autres tubes) les mesures suivantes :

- Températures de stabilisation dans vos différents bains-marie.
- Puis faites-lui effectuer deux à trois cycles et mesurez les durées des paliers obtenus à ces températures de stabilisation.

Ces températures et durées mesurées serviront de base à l'établissement d'un programme automatisé.

**Critères de manipulation et
Paramètres à programmer sur le Thermal Reactor T.R. HYBAID
pour une bonne réussite
en cyclage enzymatique avec Taq Pol.**

1. Evitez les contaminations.

Lieu de travail isolé, irradiations UV, solutions autoclavées, pipettes positives, réactifs aliquotés, gants usage unique, éclaboussures, pipettes à déplacement positif, etc...

Si vous êtes confrontés à ce type de problèmes, consultez nos spécialistes.
N'oubliez surtout pas d'effectuer des contrôles positifs et négatifs.

2. Dénaturation initiale du DNA

Elle est en moyenne de 5' pour le plasmide et 10' pour le génomique, à 92-95°C et effectués avec l'enzyme.

Cas 1 : certains types d'enzymes ne supportent pas ou mal cette dénaturation longue.

Cas 2 : dans ce cas, il y a lieu de dénaturer le DNA séparément et préalablement, plonger les tubes dans la glace 0°C immédiatement pour casser les aérosols et stabiliser le DNA dénaturé.

Préparez séparément vos tubes tests contenant le mix et l'huile de recouvrement, sous flux laminaire : passez sous UV 254 nm 5' pour les décontaminer (les nucléotides et la taq pol résistent).

Y transférer le DNA dénaturé en ouvrant 1 seul tube à la fois.

Changez de gants si vous pensez les avoir contaminés à l'ouverture des tubes de dénaturation.

Centrifugez et mettez dans le TR.

CONTROLE TUBE

3. Programmation

A) Dénaturation initiale

Cas 1 - 1ère étape : 95°C - 5 à 10' (enzymes en place) suivi des cyclages

Cas 2 - 1ère étape : vous dénaturez sans les enzymes

a) vous dénaturez à part, dans un bain marie par ex. : Sautez cette 1ère étape

b) vous dénaturez dans le TR : 95°C - 5 à 10', suivi d'un Hold à 70°C.

B) Cyclages

Les temps au palier devraient être aussi courts que possibles pour économiser l'enzyme et les nucléotides.

Il y a intérêt (sauf si vous êtes **absolument** certain d'avoir 100 % d'homologie) à introduire un ramping sur les 5 premiers cycles pour éviter la dislocation de l'hybride formé, car le TR est très rapide.

Temps d'annealing : 30 secondes en moyenne suffisent

Température d'annealing : - pour des primers courts : 12-15 bases vers 40°C

- pour des primers normaux : env. 20 bases de 50 à 60°C

Temps d'élongation : la Taq pol travaille à env. 30 bases par seconde (certains estiment même 60 bases par seconde). Pour un segment de 900 bases par ex., il suffira donc de $\frac{900}{30} = 30$ secondes

Température d'élongation : 75°C

Température de dénaturation : 95°C

Temps de dénaturation : 10 secondes (même 1" suffirait)

C) Souvent on termine par un maintien à la température d'élongation de 5 min pour épuiser les nucléotides.

Exemples de programmes

Cas A - Dénaturation initiale avec enzyme en place et primers courts

Etape Pas

1 - 1 - 95°C - 5 à 10'	}	1 x
2 - 1 - 95°C - 10"		
2 - 40°C - 30"	}	5 x
3 - 75°C - temps selon long. du segment avec ramping de 3 sec/°C		
3 - 1 - 95°C - 10"	}	30 x
2 - 40°C - 30"		
3 - 75°C - T		
4 - 1 - 75°C - 5'	}	1 x
2 - 30°C - 1'		

De même avec primers longs :

1 - 1 - 95°C - 5 à 10'	}	1 x
2 - 1 - 95°C - 10"		
2 - 50/60°C - 30"	}	5 x
3 - 75°C - temps selon segment T avec ramping 3 sec/°C		
3 - 1 - 95°C - 10"	}	25 x
2 - 50/60°C - 30"		
3 - 75°C - T		
4 - 1 - 75°C - 5'	}	1 x
2 - 30°C - 1'		

Cas B - Dénaturation sans enzymes

- On peut programmer le TR en manuel à 95°C - 5 à 10'. Après avoir sorti les tubes, et les avoir mis dans la glace, le mettre sur 70°C.

- On peut également commencer le programme par

Etape 1 - 95°C - 5 à 10'	}	1 x
70°C - Hold		

Mais attention de sortir les tubes immédiatement avant le passage au Hold.

Il suffit ensuite de programmer comme ci-dessus.

E) Après le dernier palier $30^{\circ}\text{C} - 1'$, stopper le programme. L'appareil se mettra à la température ambiante une fois la manip terminée et affichera "PROGRAM COMPLETE". Les produits n'en souffriront pas (le DNA résiste à 95°C) et les cyclages sont stérilisants. Inutile de vous lever la nuit ou de revenir durant le week end pour les mettre au congélateur, ils seront parfaitement conservés.

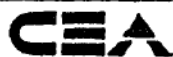
4) Mettre le T.R. en route, contrôle par le tube.

5) Amélioration des résultats pour la spécificité

La température d'annealing est une température estimée. Si vous produisez des fractions non spécifiques, remontez la température, de 1°C à la fois pour observer éventuellement une amélioration. Ceci peut éventuellement s'effectuer au détriment du rendement.

6) Pour la mise au point de méthodes précises, respectez tous les paliers ci-dessus, mais utilisez du DNA plasmidique.

ANNEXE 5



IPSN
DPT
OAR
SPRex

PHOSPHORE 32

FICHE TECHNIQUE DE RADIOPROTECTION
POUR L'UTILISATION DE RADIO-ELEMENT EN SOURCES NON SCÉLÉES

1 - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

Emetteur	β^-
Energie maximum (MeV)	1,71
Pourcentage	100
Période radioactive	14,3 jours
Organe critique	os
Période biologique	1,155 jours
Période effective	14,1 jours
LAI (AIEA)	$\approx 6,6 \text{ MBq (180 } \mu\text{Ci)}$
Energie effective (MeV)	3,5

2 - LIMITES DE DETECTION

Anthroporadiométrie : $\approx 9,5 \text{ kBq.l}^{-1}$ ($\approx 150 \text{ nCi}$)

Mesure dans les urines : limite théorique $\approx 1,5 \text{ Bq.l}^{-1}$ (40 pCi.l^{-1})

3 - DONNEES POUR L'EVALUATION DU RISQUE

3 - 1. Irradiation externe dans l'air

Une source ponctuelle non protégée de 1 mCi donne en millirem et en millisievert par heure :

	à 10 cm	à 100 cm
en β^-	3150 (31,5 mSv)	16 (0,16 mSv)

3 - 2. Contamination

3 - 2.1 Absorption maximale admissible trimestrielle pour un personnel DATR catégorie A

- Inhalation	45 μCi	(1,6 MBq)
- Ingestion	37,5 μCi	(1,4 MBq)

3 - 2.2 Limite dérivée de contamination de surfaces

- vêtements de travail	$10^{-3} \mu\text{Ci.cm}^{-2}$	(37 Bq.cm ⁻²)
- surface de travail	$6.10^{-4} \mu\text{Ci}$	(2,2 kBq.cm ⁻²)
- sols et matériel	)	)

3 - 3. Débit de dose au contact d'une seringue contenant 1 mCi

volume seringue	débit de dose	
1 cm ³		$7,7.10^5 \text{ mrad.h}^{-1}$ (7,7 Gy.h ⁻¹)
2 cm ³		3.10^5 " (3 Gy.h ⁻¹)
flacon pénicilline		5.10^4 " (5 mGy.h ⁻¹)
becner		$3,3.10^4$ " (33 mGy.h ⁻¹)
pipette 1 cm ³		5.10^4 " (500 mGy.h ⁻¹)
10 cm ³		$2,3.10^3$ " (28 mGy.h ⁻¹)

3 - 4. Le rapport entre la dose lue sur une baguette pour des agents travaillant le ^{32}P et la dose lue sur le film est de 50 (ex.: doigt $\approx 550 \text{ mrem}$ (5,5 mSv) ; poitrine $\approx 10 \text{ mrem}$ (0,1 mSv)).

3 - 5. Groupe de radiotoxicité : 3 (modérée)

4 - MISE EN OEUVRE DE LA PROTECTION

4 - 1. Ecran de protection : pour arrêter totalement les β de 1,7 MeV, il faut 4 mm de verre ou 8 mm de plexiglas (présence de rayonnement de freinage). Les gants ordinaires constituent une barrière contre la contamination mais pas contre l'irradiation externe des mains. 1 μCi (37 kBq) de ^{32}P sur 1 cm² de peau délivre un débit de dose à l'épiderme de $7,5 \text{ rad.h}^{-1}$ (75 mSv) dû à l'émission β^- .

4 - 2. Déchets : évacuation contrôlée - l'activité initiale du ^{32}P est réduite d'un facteur 10 au bout de 48 jours, d'un facteur 100 au bout de 96 jours et d'un facteur 1000 au bout de 144 jours. Conserver les déchets radioactifs 4 mois avant élimination avec les déchets conventionnels.

concernant les rejets de liquide aqueux dans les évier ordinaires, il convient qu'ils soient inférieurs à la concentration maximale admissible de $0,02 \mu\text{Ci.l}^{-1}$ (740 Bq.l^{-1}) et de limiter le rejet journalier à 10 μCi .

4 - 3. Ne jamais sous-estimer la toxicité chimique ou biologique des solutions radioactives pouvant être manipulées ou rejetées pour l'ensemble du bâtiment sous réserve de l'autorisation du responsable de sécurité de l'établissement.

4 - 4. Autres données : La contamination surfacique peut se mesurer avec une sonde SIBM du MIP 10 : 10 c.s^{-1} / $7,5.10^{-4} \text{ Bq.cm}^{-2}$ ($2,3 \text{ Bq.cm}^{-2}$).

5 - THERAPEUTIQUE

Le phosphore étant normalement présent dans l'organisme, toute contamination par le ^{32}P ne peut être traitée que par la méthode de la dilution isotopique. Il existe de nombreuses spécialités contenant du phosphore échangeable : le traitement par une telle spécialité devra cependant être massif, le but recherché ne correspondant pas à la finalité première du médicament. Doses : 5g de PO_4 dans un verre d'eau, par exemple deux capsules de "Neutroponos" contenant du phosphonate de Na et de K diabasique, ainsi que du phosphonate de Na et de K monobasique.

6 - RAPPEL METABOLIQUE

Après ingestion de phosphore, environ 75 % sont absorbés au niveau du tube digestif, puis se répartissent dans l'organisme. La fraction déposée alors dans le squelette après l'absorption est d'environ 37%.

7 - SURVEILLANCE DU PERSONNEL

Dosimétrie individuelle
Analyses radiotoxologiques des urines
Examens radiométriques

8 - LIMITES ANNUELLES D'INCORPORATION (LAI) ET LIMITES DERIVEES DE CONCENTRATION DANS L'AIR (LDCA)

RADIOELEMENT		INGESTION	INHALATION	
		a	b	c
^{32}P	LAI (Bq) LDCA (Bq.m^{-3})	2×10^7 -	3×10^7 1×10^7	1×10^7 5×10^6

a) Le phosphore d'origine alimentaire est bien absorbé par l'appareil gastro intestinal

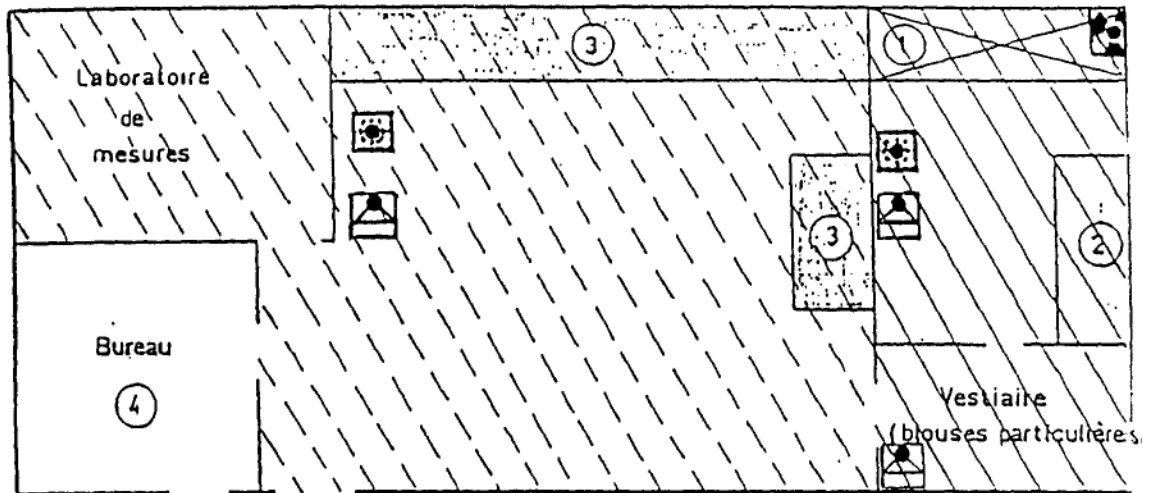
b) Tous les composés du phosphore, sauf les phosphates qui sont indiqués à la note c

c) Phosphates de Zn^{2+} , Sn^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Bi^{3+} et de lanthanides

9 - TEXTES DE REFERENCE

- Décret 66-450 du 20 juin 1966 relatif aux principes généraux de protection contre les rayonnements ionisants.
- Décret 67-228 du 15 mars 1967 portant règlement d'administration publique relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants.
- Arrêtés d'application du décret 67-228 du 15 mars 1967, parus au J. O. du 8 juin 1968, et particulièrement :
 - arrêté du 18 avril 1968 approuvant les méthodes de contrôle élaborées par le Service Central de Protection Contre les Rayonnements Ionisants ;
 - arrêté du 19 avril 1968 précisant les conditions d'utilisation des dosimètres individuels destinés au contrôle des équivalents de doses reçus par les travailleurs directement affectés à des travaux sous rayonnements et exposés au risque d'irradiation externe ;
 - arrêté du 23 avril 1968 approuvant les termes des recommandations aux médecins exerçant la surveillance médicale des travailleurs soumis aux dangers des rayonnements ionisants.
 - décret n° 86.1103 du 02 octobre 1986.
- Circulaire 828 du 03 août 1972 relative à l'utilisation des radioéléments artificiels en sources non scellées dans le domaine biologique et médical (Ministère de la Santé Publique).
- Avis aux utilisateurs de radioéléments soumis au régime d'autorisation prévu par le Code de la Santé Publique, relatif à l'élimination des déchets radioactifs (sources non scellées exclusivement), (J.O. du 06 juin 1970).
- Recommandation n° 22 de la CIPR. (Les publications de la CIPR sont distribuées en France par les éditions GAUTHIER-VILLARS).





Légende:

	Paillasse	①	Manipulation des molécules marquées sous - jusqu'à 16 mCi	hotte en ZC
	Hotte ventilée $v > 0,5 \text{ m/s}$	②	Manipulation des molécules marquées sur - jusqu'à 1,6 mCi	paillasse en ZC
	Boîte à gants	③	Manipulation des molécules marquées sur - jusqu'à 0,16 mCi	paillasse en ZS
	Zone contrôlée (ZC)	④	Interdiction rigoureuse de faire pénétrer tout produit radioactif	
	Zone surveillée (ZS)			
	Zone non réglementée			

Signes conventionnels utilisés en radioprotection :

	Appareil de contrôle de contamination atmosphérique
	Appareil de contrôle de contamination de surface détection β
	Appareil de contrôle d'irradiation
	Dépôt de matériel de conditionnement de déchets contaminés
	Point de rejet des effluents gazeux contaminés sans dispositif d'épuration
	Point de rejet des effluents gazeux contaminés avec dispositif d'épuration
	Emplacement de sources de rayonnements ionisants (stockage)

INSTALLATION POUR MARQUAGE ET MANIPULATION
DE MOLECULES ORGANIQUES MARQUEES AU PHOSPHORE-32

A U T O R I S A T I O N D ' I M P R E S S I O N

De la Thèse dont l'intitulé est :

*Apport de la PCR dans les méthodes de biologie moléculaire
appliquées au diagnostic des adénomes hypophysaires*

CANDIDAT : M Yves ROSUEL

VU

GRENOBLE, le 22 juin 1994

Le Président du Jury



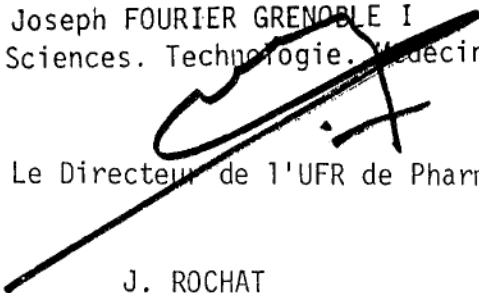
VU

GRENOBLE, le 23 juin 1994

p/Le Président de l'Université

Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

Le Directeur de l'UFR de Pharmacie



J. ROCHAT

