

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication : **2 636 075**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 11693**

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 Q 1/68.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 7 septembre 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 10 du 9 mars 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SOCIETE EUROPEENNE DE BIOTECH-
NOLOGIE, société anonyme de droit belge.* — BE.

⑦2 Inventeur(s) : Didier Georges Jean-Marie Allaer ; Michel
Thierry Jean-François Rossius ; André Jean Joseph Re-
nard.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Lemoine et Bernasconi.

⑤4 Procédé de détection des bactéries, levures, parasites et autres eucaryotes, notamment dans les produits alimentaires.

⑤7 A des fins de détection, éventuellement d'identification, des bactéries et des eucaryotes, notamment levures, champignons et parasites, notamment dans les produits alimentaires, on applique un procédé comprenant les étapes consistant en :

- extraire l'ARN ribosomal éventuellement présent dans le produit,
- transcrire l'ARN ribosomal en ADN en présence de transcriptase inverse,
- transcrire le brin d'ADN ainsi synthétisé en un brin complémentaire en présence d'une ou plusieurs amorces,
- amplifier le brin d'ADN obtenu en présence d'au moins une paire d'amorces déterminant une séquence connue détectable,
- détecter la séquence amplifiée.

L'ARN ribosomal concerné est plus particulièrement l'ARNr 16S ou l'ARNr eucaryote correspondant.

Il est également question d'amorces et de sondes d'ADN pour la mise en œuvre dudit procédé.

FR 2 636 075 - A1

D

Procédé de détection des bactéries, levures, parasites et autres eucaryotes, notamment dans les produits alimentaires.

L'invention concerne un procédé de détection des
5 bactéries dans des milieux susceptibles d'être contaminés, notamment dans les produits alimentaires, l'invention pouvant également être appliquée à la détection d'eucaryotes, tels que notamment levures, champignons, parasites.

10 Des procédés de détection et d'identification de bactéries et d'eucaryotes sont connus depuis longtemps. Cependant, ils font largement appel à la culture de cellules en milieu nutritif. Le passage en culture est une méthode longue qui peut demander de plusieurs jours à plusieurs
15 semaines, ce qui peut être incompatible avec les nécessités des industries alimentaires, d'autant plus que la méthode n'est pas toujours suffisamment rapide et sensible dans le cas où la concentration cellulaire est faible.

D'autre part, ces cultures destinées à la multiplication des cellules bactériennes ou autres exigent souvent des
20 milieux de culture spécifiques ou sélectifs, que ce soit pour la recherche des bactéries totales ou pour la recherche

de types précis de bactéries, ce qui multiplie les manipulations et les risques d'erreur.

Il était donc intéressant de rechercher un procédé permettant la détection de cellules bactériennes ou autres dans les produits alimentaires sans passage en culture de cellules, même dans le cas de concentrations bactériennes ou cellulaires minimales.

Il existe un procédé, décrit par SAIKI et al., Science, 230, 1530-1534 (1985), qui permet d'amplifier des séquences d'acides nucléiques en hybridant des amorces et en synthétisant le brin complémentaire de la séquence depuis l'amorce en présence de nucléotides triphosphates et d'ADN polymérase ou autres enzymes de polymérisation, de telle sorte que le produit d'extension de l'amorce serve de matrice pour la synthèse de la séquence et ainsi de suite.

Ce procédé a été appliqué, selon la demande de brevet EP-A-0.229.701, à la détection de virus, y compris HIV, par amplification de séquences déterminées caractéristiques de l'ADN viral, ou éventuellement de l'ARN viral présent dans un prélèvement humoral ou cellulaire. Ce procédé comprend l'utilisation d'amorces ADN qui viennent s'hybrider en des endroits précis des deux brins d'ADN complémentaires obtenus par dénaturation du double brin viral de départ. L'addition d'un agent de polymérisation tel que l'ADN-polymérase induit la répllication de la séquence voulue. L'amplification est assurée par le renouvellement de l'opération.

Ce procédé ne peut cependant être transposé au domaine de la détection des bactéries ou d'eucaryotes dans les produits alimentaires, ne serait-ce qu'en raison des concentrations infimes d'ADN bactérien ou nucléaire dans des environnements très particuliers et variables.

D'autre part, un tel procédé nécessiterait un grand nombre d'amorces et de sondes de détection spécifiques pour l'identification des bactéries ou autres cellules, donc une multiplicité de manipulations, ce qui le rend trop lourd pour la présente application.

On a maintenant déterminé les séquences de nombreux ARN ribosomaux de bactéries très variées. Ces ARNr présentent une grande homologie de sorte qu'on n'a guère essayé de s'en servir à des fins de détection. Cependant Ulf B. Göbel et al, dans *Journal of General Microbiology*, 133, 1969-1974 (1987), ont détecté et identifié des cultures de bactéries, en l'occurrence *Mycoplasma pneumoniae*, après extraction de l'ARN, par hybridation de l'ARNr 16S avec des sondes d'ADN complémentaires de régions spécifiques d'espèce de cet ARN ribosomal. Ce procédé s'est avéré plus sensible que l'hybridation de l'ADN génomique. Il est cependant inadapté à la détection de bactéries à de faibles concentrations dans les produits alimentaires.

L'invention a donc pour objectif de fournir un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries ou d'eucaryotes dans les produits alimentaires qui soit d'une grande sensibilité et qui permette la détection de la présence des cellules, et au besoin leur identification.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un tel procédé qui puisse combiner la détection et l'identification en une manipulation.

Un autre objectif encore de l'invention est de fournir un tel procédé qui puisse être mis en oeuvre rapidement, notamment en quelques heures.

L'invention a pour objet un procédé de détection, et éventuellement d'identification, des bactéries, levures, champignons, parasites et autres eucaryotes, notamment dans les produits alimentaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- extraire l'ARN ribosomal éventuellement présent dans le produit ou milieu étudié,
- transcrire l'ARN ribosomal en ADN en présence de transcriptase inverse,
- transcrire le brin d'ADN ainsi synthétisé en un brin d'ADN complémentaire en présence d'une ou plusieurs amorces,
- amplifier le brin d'ADN obtenu , de préférence en

présence d'au moins une paire d'amorces déterminant une séquence connue détectable,

- détecter la séquence amplifiée.

L'invention s'applique de préférence à l'ARN ribosomal
5 16S ou éventuellement à l'ARN ribosomal 23S ou 5S ou encore
aux ARN ribosomaux correspondant des cellules eucaryotes.

Le procédé d'extraction est de préférence un procédé du
type de celui décrit par Kirby K.S. et al., Biochem. J.104,
258-262, 1987. Un exemple d'un tel procédé sera décrit plus
10 loin en détail. Il présente le double avantage d'être rapide
et d'assurer une récupération optimale de l'ARN. Par extrac-
tion dans le sens de l'invention, on entend extraction hors
des parois bactériennes, sans qu'il soit nécessaire
d'éliminer les autres constituants bactériens ni les consti-
15 tuants alimentaires.

De préférence, mais non obligatoirement, l'ARN ribo-
somal est hybridé avec celle des deux amorces qui lui est
complémentaire, mais tout autre moyen assurant le démarrage
de la transcription inverse peut être utilisé.

20 Le brin d'ARN est déployé, par exemple par la chaleur
ou tout autre moyen, puis transcrit à une température compa-
tible avec l'hybridation de l'amorce ou des amorces sur
son ou ses sites spécifiques. La transcriptase inverse
assure ensuite la synthèse du brin d'ADN par extension de
25 l'amorce de façon à inclure la région déterminée qui sera
détectée après amplification. Plusieurs amorces s'hybridant
à plusieurs endroits de l'ARNr peuvent aussi être utilisées.
On réalise ensuite la synthèse d'un brin d'ADN
complémentaire au brin d'ADN synthétisé par la transcription
30 inverse grâce à une ou plusieurs amorces spécifiques.

De façon surprenante, on constate que l'on peut ainsi
transcrire l'ARNr en un fragment entier d'ADN constitué par
ou comprenant la région déterminée.

L'amplification met en oeuvre deux amorces, chacune
35 d'elles allant s'hybrider sur son site spécifique situé sur
son brin d'ADN complémentaire. La technique d'amplification

peut être celle décrite par SAIKI et al., utilisant notamment une ADN polymérase thermorésistante.

Conformément à l'invention, les amorces peuvent encadrer (en en faisant partie ou non) des régions variables, spécifiques d'espèce ou des régions homologues. De préférence, l'une de ces amorces est identique à l'amorce utilisée dans l'étape de transcription. Les termes "régions homologues" et "régions variables", sont des régions du type de celles décrites dans : Oligonucléotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between Mycoplasma species, Ulf B. Göbel et al., J. of General Microbiology (1987), 133, 1969-1974.

Les brins d'ADN amplifiés pourront donc être formés de, ou comporter, des zones spécifiques ou des zones homologues, ou bien comporter des zones homologues et des zones spécifiques.

On pourra donc soit détecter simplement la présence de bactéries, soit les identifier.

Les amorces d'ADN utilisées dans les différentes étapes du procédé conforme à l'invention peuvent avoir une longueur variable, mais, pour des raisons de sélectivité de l'hybridation, on préfère qu'elles comportent au moins 20 bases. Les autres facteurs conditionnant la sélectivité de l'hybridation, tels que température et salinité, seront ajustés, de façon en soi connue, pour une hybridation sélective.

La détection proprement dite est réalisée de préférence par hybridation à l'aide de sondes ADN marquées ou non recouvrant, de préférence en partie, la région amplifiée, la révélation s'effectuant par exemple par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7 %, ou tout moyen usuel qualitatif ou quantitatif approprié.

Les sondes peuvent être générales ou spécifiques, c'est-à-dire correspondre respectivement à des régions homologues ou à des régions variables spécifiques.

L'invention s'applique aux différents produits

alimentaires susceptibles d'être contaminés par des bactéries, notamment produits lactés, carnés ou d'origine végétale.

5 L'invention peut également être appliquée à la détection et à l'identification des bactéries ou de cellules ou microorganismes vivants eucaryotes, notamment levures, champignons, parasites, dans d'autres milieux, notamment des prélèvements liquidiens ou tissulaires d'organismes animaux ou humains.

10 L'invention a également pour objet les amorces (primers) permettant la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, ainsi que les nouvelles sondes permettant la détection des régions choisies. Les amorces se caractérisent par une séquence nucléotidique dérivée d'un fragment de
15 l'ARNr, cette séquence comportant de préférence au moins 15 nucléotides.

Parmi les amorces générales, c'est-à-dire homologues, figurent notamment :

(B2) 5' TAC, CCC, ACC, TAC, TAG, CTA, AT 3' ;

20 (A2) 5' CTA, CTG, GAA, ACG, GTA, GCT, AA 3'.

Parmi les amorces spécifiques pour E. coli figurent notamment :

(B1) 5' AAC, TTT, ACT, CCC, TTC, CTC, CC 3' ;

(B'1) 5' GTA, ACG, TCA, ATG, AGC, AAA, GG 3' ;

25 (Ces amorces peuvent être utilisées également pour la transcription inverse. L'amorce B'1 est préférée, l'amorce B1 ayant tendance à s'hybrider également à un autre site).

(A1) 5' AAC, GTC, GCA, AGA, CCA, AAG, AG 3'.

30 Comme sondes générales pour la révélation, on peut prévoir notamment :

(sonde 1) 5' TAC, CCC, ACC, TAC, TAG, CTA, AT 3'

et/ou la séquence complémentaire

Comme sondes spécifiques de E. coli, on peut prévoir notamment :

35 (sonde 2) 5' AAC, GTC, GCA, AGA, CCA, AAG, AG 3'

et/ou la séquence complémentaire.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante, faite à titre d'exemple non limitatif, à partir d'un produit contenant *E. coli*, et se référant à la figure unique 5 représentant la transcription ADN d'une séquence partielle de l'ARNr 16S d'*E. coli*.

1. Extraction de l'ARN :

Le procédé d'extraction qui va être décrit est une modification de la méthode au phénol décrite par Kirby et 10 al. citée précédemment.

D'autres procédés sont toutefois possibles, quoique plus longs à mettre en oeuvre. Il s'agit des procédés selon :

- Auffray C. et Rougeon F., Eur. J. Biochem, 107, 303-314 15 (1980),

- Zdzislaw Krawczyk et Carl Wu, Analytical Biochemistry 165, 20-27 (1987),

- Piotr Chomczynski et Nicoletta Sacchi, Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987).

20 Le procédé est le suivant :

- le produit alimentaire est mis en suspension dans un milieu physiologique.

- les cellules (1.10^8 cellules) sont récupérées par centrifugation du milieu (15 mn à 5 000 g) ou par filtration sous 25 vide ;

- on ajoute un volume égal (5 ml environ) de la solution suivante : (1x)

Tri-isopropylnaphtalène sulfonate ... 1 % (poids/Vol.)

4-amino salicylate (sel de Na) ... 6 % (P/V)

30 Tris-HCl (pH = 8,3), concentration finale ... 100 mM

Mélange phénolique (voir ci-dessous) ... 6 % (V/V)

Mélange phénolique : - phénol hautement purifié = 500 g

- 8-hydroxyquinoline = 0,5 g

- saturation de ce qui précède avec

du Tris-HCl 50 mM (pH = 8,3).

- et 12 à 14 g de billes de verre (4,5 à 5 mm de diamètre) ;
- on agite au Vortex pendant 4 mn (cette étape est importante car elle procure une bonne agitation) ;
- 5 - on ajoute un volume égal (environ 6 ml) d'un mélange de phénol, chloroforme et alcool iso-amylque 50/50/1 (V/V), et on agite au Vortex vigoureusement pendant 2 mn ;
- on introduit le liquide obtenu dans des tubes de centrifugation et l'on centrifuge à 7 000 g pendant 5 mn, à 5°C ;
- 10 - on récupère la phase aqueuse supérieure et on l'agite au Vortex vigoureusement pendant 2 mn avec un volume égal d'un mélange de phénol, chloroforme et alcool iso-amylque 50/50/1 (V/V), puis l'on centrifuge à 7 000 g pendant 5 mn à 5°C ;
- 15 - on recommence l'extraction au phénol, chloroforme, alcool iso-amylque jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'une interface très réduite ;
- on mesure le volume de la phase aqueuse et on fait précipiter les acides nucléiques avec 1/9 volume de NaOAc 3M
- 20 (pH = 6) et avec un volume égal d'isopropanol ;
- on laisse précipiter pendant 10 mn à 4°C ;
 - on centrifuge à 10 000 g pendant 5 mn ;
 - on élimine le surnageant ;
 - on lave l'échantillon avec 5 ml d'éthanol absolu ;
- 25 - on élimine le surnageant et on sèche l'échantillon ;
- on dissout l'échantillon dans 10 à 100 µl d'eau.
2. Hybridation de l'amorce pour la transcriptase inverse (amorce B, voir plus loin) :

- on prélève de 1 à 8 µl de la solution d'ARN obtenue ci-
- 30 dessus ;
- on ajoute 20 ng de l'oligonucléotide servant d'amorce ;
 - on amène à une concentration finale de :
- 250 mM KCl
 - 2,5 mM Tris-HCl pH = 7
- 35 0,25 mM EDTA

dans un volume final de 10 μ l ;

- on chauffe pendant 15 minutes à 95°C, puis
- 30 minutes à température ambiante (ou une température plus élevée).

5 Cette température est déterminée par la séquence de l'oligonucléotide et par la concentration en sel du milieu, dans le cas présent 0,25 M. Différentes méthodes existent pour déterminer cette température :

- MEINKOTH, J. and WAHL, G. Anal. Biochem. 138, 267-284, 10 1984,
- WALLACE, R.B. et al., Nucl. Acids Res., 6, 3543-3656, 1979,
- GOEDEL, D.V. et al., Nature, 287, 411-416, 1980,
- SUGGS, S.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 15 6613-6617, 1981,
- SZOSTAK, J.W. et al., Methods Enzymol., 68, 419-428, 1979,
- SUGGS, S.V. et al., ICN-UCLA Symp. Dev. Biol.; 23, 683-693, 1981.

20 3. Synthèse du brin d'ADN par la transcriptase inverse:

- on ajoute 20 unités de transcriptase inverse M-MLV : clone M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) de la transcriptase inverse, de Bethesda Research Laboratories ;

- on ajuste à une concentration finale de :

- 25 7 mM Tris-HCl pH = 8,6
- 7 mM MgCl₂
- 3,5 mM DTT
- 60 μ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 0,6 ng/ μ l d'amorce B
- 30 75 mM KCl

dans un volume final de 33 μ l ;

- on laisse incuber 30 minutes à 37°C.

4. Amplification :

- on amène la solution à une concentration de :
 - 50 mM KCl
 - 10 mM Tris-HCl pH = 8,6
 - 2,5 mM MgCl₂
- 5 200 µg/ml Gélatine
- 200 µM dNTP
- 10 ng/µl d'amorce A
- 10 ng/µl d'amorce B
- dans un volume final de 100µl ;
- 10 - on ajoute 4 unités de TAQ (Thermus Aquaticus DNA Polym-
erases de New England Biolabs, ref. : KALÉDIN, A.S. et al.,
Biokhimiia, 45 (4), 644-651, 1980) ;
 - on chauffe 90 secondes à 93°C ;
 - on amène à température ambiante pendant 90 secondes ou à
- 15 une température plus élevée, et/ou pendant un temps plus
important selon le cas ;
 - on incube 120 secondes à 46°C ;
 - on répète ce cycle de températures 12 fois ;
 - on ajoute 4 unités de TAQ ;
- 20 - et on répète ce cycle 12 fois (ou plus).

L'étape d'amplification peut être avantageusement menée dans un appareil tel que celui décrit dans la demande de brevet européen EP-A-O 236 069.

5. Révélation :

- 25 L'amplification peut être visualisée par différentes méthodes et notamment par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7 % ou hybridation à l'aide de sondes recouvrant en partie la zone amplifiée.

30 On a appliqué le procédé ci-dessus à deux cas, avec des amorces et des sondes conformes à l'invention, rapportées sur la figure.

La figure représente une séquence d'ADN correspondant à une séquence partielle de l'ARNr 16S de E. coli. Le brin

d'ADN complémentaire du premier n'est pas représenté. Sondes et amorces y sont localisées, étant entendu que certaines d'entre elles ont leur site spécifique sur le brin représenté (ci-après B1, B'1, B2, sonde 1), d'autres sur le 5 brin complémentaire non représenté (ci-après A1, A2, sonde 2).

Cas 1 : amorce spécifique, sonde générale :

- amorce A :
5'AAC, GTC, GCA, AGA, CCA, AAG, AG 3' = amorce A1
- 10 - amorce B :
5'AAC, TTT, ACT, CCC, TTC, CTC, CC 3' = amorce B1
5'GTA, ACG, TCA, ATG, AGC, AAA, GG 3' = amorce B'1
(ces amorces B servent également pour la transcriptase inverse)
- 15 - sonde = 5'TAC, CCC, ACC, TAC, TAG, CTA, AT 3' = sonde 1,
on peut également utiliser la sonde complémentaire, c'est-à-dire 5'ATT, AGC, TAG, TAG, GTG, GGG, TA 3', ou les deux ensemble.

Cas 2 : amorce générale, sonde spécifique :

- 20 - amorce A :
5' CTA, CTG, GAA, ACG, GTA, GCT, AA 3' = amorce A2
- amorce B :
5'TAC, CCC, ACC, TAC, TAG, CTA, AT 3' = amorce B2
- sonde : 5'AAC, GTC, GCA, AGA, CCA, AAG, AG 3' = sonde 2
- 25 ou la complémentaire, ou les deux ensemble.

Les résultats ont démontré l'efficacité des amorces spécifiques A1 et B'1 ainsi que de la sonde générale 1 et des amorces générales A2 et B2 ainsi que de la sonde spécifique 2. Par contre, l'amorce B1 s'est avérée être peu performante car elle s'hybride à un autre endroit indiqué 30 par X sur la figure.

Ces deux cas ne sont bien sûr pas limitatifs. On peut envisager tous les cas possibles, en particulier le cas suivant : amorce générale, sonde générale.

35 On comprend que l'exemple décrit permet, en utilisant une machine du commerce, et avec un personnel assez peu

qualifié, de détecter, voire d'identifier la présence de bactéries dans un échantillon de produit alimentaire, par exemple du lait ou une conserve, en quatre à six heures, la plus grande partie des opérations pouvant être automatisée.

- 5 Le procédé est sensible à la présence de quelques bactéries à quelques centaines de bactéries par ml.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection, et éventuellement d'identification, des bactéries et des eucaryotes, notamment levures, champignons et parasites, notamment dans les produits alimentaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant en :

- extraire l'ARN ribosomal éventuellement présent dans le produit,
- transcrire l'ARN ribosomal en ADN en présence de transcriptase inverse,
- transcrire le brin d'ADN ainsi synthétisé en un brin complémentaire en présence d'une ou plusieurs amorces,
- amplifier le brin d'ADN obtenu en présence d'au moins une paire d'amorces déterminant une séquence connue détectable,
- détecter la séquence amplifiée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on applique lesdites étapes à l'ARNr 16S ou l'ARNr eucaryote correspondant.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'on procède à une extraction au phénol.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence déterminée par les amorces correspond à une séquence homologue d'ARNr.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence déterminée par les amorces correspond à une séquence spécifique d'espèce d'ARNr.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on amplifie l'ADN par succession de cycles thermiques avec dénaturation d'ADN à haute température en présence de polymérase thermorésistante.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on détecte la séquence

amplifiée à l'aide d'une sonde nucléotidique.

8. Amorces pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles sont dérivées d'une séquence d'ARNr bactérien.

5 9. Amorces selon la revendication 8, caractérisées en ce qu'elles comportent l'une des séquences décrites sous les références A1, A2, B1, B'1, B2, ou les séquences complémentaires.

10 10. Sondes d'ADN pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles comportent l'une des séquences décrites sous les références (sonde 1), (sonde 2), ou les séquences complémentaires.

FIGURE : SEQUENCE PARTIELLE DE L'ARN 16S DE E. COLI.

```

5' GGG GGA TAA CTA CTG GAA ACG GTA GCT AAT ACC GCA TAA CGT CGC
      "          Primer A2          "          "
AAG ACC AAA GAG GGG GAC CTT CGG GCC TCT TGC CAT CGG ATG TGC
-----
Primer A1      "
Sonde 2

CCA GAT GGG ATT AGC TAG TAG GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG
      "          Primer B2          "
      Sonde 1

ACG ATC CCT AGC TGG TCT GAG AGG ATG ACC AGC CAC ACT GGA ACT

GAG ACA CGG TCC AGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT ATT
      .. ... . . . .
      X

GCA CAA TGG GCG CAA GCC TGA TGC AGC CAT GCC GCG TGT ATG AAG

AAG GCC TTC GGG TTG TAA AGT ACT TTC AGC GGG GAG GAA GGG AGT
      "          Primer B1
-----

AAA GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA CGT TAC CCG CAG A 3'
      "          Primer B'1
-----

```

----- = Zone considérée comme variable.