

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/77250 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12Q 1/68,
C12N 15/10

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01655

(22) Date de dépôt international: 14 juin 2000 (14.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07503 14 juin 1999 (14.06.1999) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA

RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

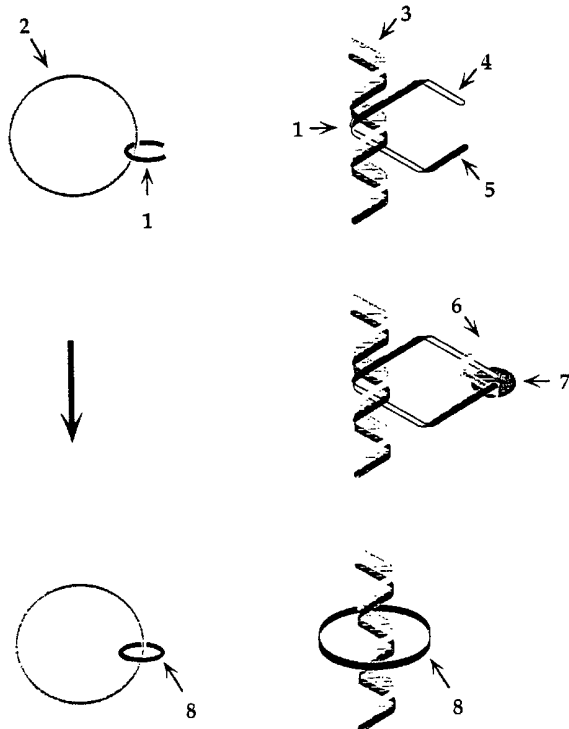
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ESCUDE,
Christophe [FR/FR]; 18, rue Rambuteau, F-75003 Paris
(FR). GARESTIER, Thérèse [FR/FR]; 35, rue Broca,
F-75005 Paris (FR). HELENE, Claude [FR/FR]; 35, rue
Broca, F-75005 Paris (FR). ROULON, Thibaut [FR/FR];
22, rue Noas Dausmesnil, F-77370 Nangis (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR CIRCULARIZING OLIGONUCLEOTIDES AROUND A DOUBLE STRANDED NUCLEIC ACID,
RESULTING STRUCTURES AND USES THEREOF

(54) Titre: PROCEDE DE CIRCULARISATION D'OLIGONUCLEOTIDES AUTOUR D'UN ACIDE NUCLEIQUE EN
DOUBLE BRIN, LES STRUCTURES OBTENUES ET LEURS APPLICATIONS



(57) Abstract: The invention concerns a method for circularizing an oligonucleotide which consists in: incubating a double stranded nucleic acid comprising a target sequence, with a single stranded oligonucleotide comprising a central part capable of being fixed on said target sequence, bound by spacer segments to 5' and 3' terminal sequences, said sequences being: either a) complementary to the sequence of an oligonucleotide matrix; or x) partly complementary to each other, so as to be capable of being hybridized to each other forming a double strand while preserving a single stranded end, which is capable of being hybridized with the terminal sequence of another oligonucleotide, called loop-oligonucleotide, which has a hairpin structure, with one single stranded part and a folded part forming a double strand; contacting, in the first case a) the complex formed with said oligonucleotide matrix, in conditions enabling the hybridization of the 3' and 5' ends, adjacently, with the matrix, and in the case x), contacting the complex formed with said loop-oligonucleotide, in conditions enabling, through hybridization of the free ends of the single stranded oligonucleotides and of the loop-oligonucleotide, the juxtaposition of the 3' and 5' ends of said oligonucleotides; ligating the hybridized ends so as to circularize the oligonucleotide around the double stranded nucleic acid and, optionally, isolating the circularized structure. The invention also concerns the applications and the resulting structures obtained for diagnostic and therapeutic purposes.

[Suite sur la page suivante]



WO 00/77250 A2



(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé:** Le procédé de circularisation d'un oligonucléotide selon l'invention comprend: l'incubation d'un acide nucléique double brin comprenant une séquence cible, avec un oligonucléotide simple brin comprenant une partie centrale capable de se fixer sur ladite séquence cible, reliée par des séquences espaceurs à des séquences terminales en 5' et 3', ces séquences étant: soit a) complémentaires de la séquence d'une matrice oligonucléotidique; soit x) partiellement complémentaires l'une de l'autre, de manière à pouvoir s'hybrider l'une à l'autre en formant un double brin tout en conservant une extrémité en simple brin, laquelle est capable de s'hybrider à la séquence terminale d'un autre oligonucléotide, dit oligonucléotide-boucle, qui possède une structure en épingle à cheveux, avec une partie en simple brin et une partie repliée qui forme un double brin, la mise en contact, dans le premier cas a), du complexe formé avec ladite matrice oligonucléotidique, dans des conditions permettant l'hybridation des extrémités 5' et 3', de manière adjacente, à la matrice, et dans le cas x), celle du complexe formé avec ledit oligonucléotide-boucle, dans des conditions permettant, par l'hybridation des extrémités libres de l'oligonucléotide simple brin et de l'oligonucléotide-boucle, la juxtaposition des extrémités 5' et 3' de ces oligonucléotides, la ligation des extrémités hybridées, de manière à circulariser l'oligonucléotide autour de l'acide nucléique double brin et, si on le souhaite, l'isolement de la structure circularisée. Application du procédé et des structures obtenues en diagnostic et thérapeutique.

PROCEDE DE CIRCULARISATION D'OLIGONUCLEOTIDES AUTOUR D'UN ACIDE
NUCLEIQUE EN DOUBLE BRIN, LES STRUCTURES OBTENUES ET LEURS
APPLICATIONS

5

L'invention a pour objet un procédé de circularisation d'oligonucléotides autour d'un acide nucléique en double brin, les structures obtenues et leurs applications.

10

On a déjà décrit des oligonucléotides à courte chaîne pouvant se fixer spécifiquement à de l'ADN en double hélice pour former une structure en triple hélice ou triplex. La fixation s'effectue au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN avec établissement d'interactions non covalentes.

15

De tels oligonucléotides ont été développés dans le but de contrôler artificiellement l'expression de gènes spécifiques au niveau de la transcription, mais peuvent être utilisés pour d'autres applications, comme par exemple la purification de plasmides.

20

On a également proposé de modifier chimiquement les oligonucléotides formant des triplex pour induire des modifications irréversibles des acides nucléiques cibles. Le clivage de la cible peut être obtenu avec un oligonucléotide lié de manière covalente à un complexe Fe-EDTA ou Cu-phénanthroline, tandis que des conjugués psoralène-oligonucléotides peuvent être réticulés à leur cible après irradiation UV.

25

30

L'intérêt s'est porté, ces dernières années, sur des oligonucléotides circulaires en raison de leurs propriétés topologiques et de reconnaissance d'acides nucléiques.

Par rapport aux oligonucléotides linéaires, les oligonucléotides circulaires permettent de concevoir des outils d'analyse génétique améliorés, en particulier grâce à leur amplification efficace par répllication en boucle.

La liaison d'un oligonucléotide circulaire préformé à un court fragment d'ADN en double brin peut être effectuée selon deux voies topologiquement distinctes.

Dans l'une de ces voies, l'oligonucléotide se fixe dans le grand sillon de l'ADN tout en restant à l'extérieur de ce duplex. Dans l'autre voie, l'oligonucléotide circulaire encercle le duplex après que l'une des extrémités de celui-ci se soit glissée dans le cercle oligonucléotidique. Cette deuxième structure peut être insérée dans un fragment d'ADN en double brin circulaire plus long, mais cette procédure nécessite l'intervention d'étapes de ligation dont le rendement et l'efficacité sont limités.

L'invention vise un nouveau procédé permettant la circularisation d'un oligonucléotide directement autour d'un acide nucléique en double brin, quels que soient sa longueur et son état topologique et, sans qu'il soit nécessaire de modifier enzymatiquement ou chimiquement la cible d'acide nucléique. Ce procédé repose sur l'élaboration d'un complexe à trois brins, comportant un oligonucléotide pouvant s'enrouler autour du double brin d'acide nucléique, et pouvant être circularisé.

Le procédé de circularisation selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend

- l'incubation d'un acide nucléique double brin comprenant une séquence cible, avec un oligonucléotide simple brin comprenant une partie centrale capable de se fixer sur ladite séquence cible, reliée par des séquences espaceurs à des séquences terminales en 5' et 3', ces séquences étant
- 5 - soit a) complémentaires de la séquence d'une matrice oligonucléotidique,
- soit x) partiellement complémentaires l'une de l'autre, de manière à pouvoir s'hybrider l'une à l'autre en formant un double brin tout en conservant une extrémité en simple brin, laquelle est capable de s'hybrider à la séquence terminale d'un autre oligonucléotide, dit oligonucléotide-boucle, qui possède une structure en épingle à cheveux, avec une partie en simple
- 10 brin et une partie repliée qui forme un double brin, ladite étape d'incubation étant réalisée dans des conditions permettant la fixation de l'oligonucléotide simple brin au niveau de la séquence cible par formation de liaisons réversibles, ce qui conduit à l'enroulement de l'oligonucléotide
- 20 autour de sa cible, et dans le cas x), après une étape de chauffage, afin de permettre l'ouverture de l'oligonucléotide et son enroulement autour de l'ADN cible avant réhybridation de ses extrémités,
- 25 - la mise en contact dans le premier cas a) du complexe formé avec ladite matrice oligonucléotidique, dans des conditions permettant l'hybridation des extrémités 5' et 3', de manière adjacente, à la matrice, et dans le cas x), la mise en contact du complexe formé avec ledit oligonucléotide-boucle, dans des
- 30 conditions permettant, par l'hybridation des extrémités libres de l'oligonucléotide simple brin et de l'oligonucléotide-boucle, la juxtaposition des extrémités 5' et 3' de ces oligonucléotides,

- la ligation des extrémités hybridées, de manière à circulariser l'oligonucléotide simple brin (cas a) ou l'oligonucléotide simple brin et l'oligonucléotide boucle (cas x), autour de l'acide nucléique double brin et, si on le souhaite,
- l'isolement de la structure circularisée, où l'acide nucléique cible est cadénassé par l'oligonucléotide circulaire, suivi le cas échéant de sa purification.

On observera que, de manière avantageuse, cette technique de circularisation est réalisable sans modification chimique ou enzymatique de l'acide nucléique cible et n'implique qu'une courte séquence sur la cible comme site de reconnaissance.

L'acide nucléique double brin mis en oeuvre selon l'invention est constitué, selon un mode de réalisation, par un ADN en double hélice.

On notera qu'un tel ADN en double hélice peut être un plasmide linéaire ou circulaire, et notamment un plasmide circulaire surenroulé.

En ce qui concerne l'oligonucléotide simple brin, qui doit être circularisé, conformément à l'invention, autour de la cible d'acide nucléique, cet oligonucléotide doit avoir une longueur suffisante pour, d'une part, se lier à la cible et, d'autre part,

- cas a) se lier à la matrice oligonucléotidique,
- cas x) permettre l'hybridation de ses extrémités et l'hybridation de l'oligonucléotide boucle.

Il peut ainsi comporter plus de 20 nucléotides, notamment de 20 à plusieurs centaines de nucléotides. On utilise avantageusement un oligonucléotide comportant de 20 à 300
5 nucléotides, notamment de 30 à 100, avec comme partie centrale, destinée à se fixer sur la cible d'acide nucléique, une séquence, de 10 à 25 nucléotides.

Selon une disposition de l'invention, on peut utiliser
10 des oligonucléotides simple brin dans lesquels l'enchaînement comportant des bases nucléiques n'est pas constitué que de liaisons internucléosidiques naturelles de type phosphodiester, mais peut comporter par exemple des liaisons de type phosphorothiate, phosphoramidate, méthylphosphonate ou acide
15 nucléique peptidique, ou des mélanges de ces liaisons.

On peut également utiliser des oligonucléotides simple brin dans lesquels les nucléotides sont modifiés chimiquement au niveau des sucres, notamment en position 2', par exemple par des
20 groupements amino ou méthoxy, ou au niveau des bases, par exemple de 5-propinyl-pyrimidines.

L'oligonucléotide simple-brin mis en oeuvre peut comporter un ou plusieurs liens non nucléosidiques, par exemple
25 de type hexaéthylène glycol, ou être relié covalamment à une ou plusieurs molécules stabilisant les triple-hélices, comme par exemple les benzo-indolo-quinolines, les benzo-quin-
quinoxalines, les benzo-pyrido-indoles et les benzo-pyrido-
quinoxalines.

30

Selon une autre disposition de l'invention, l'oligonucléotide simple-brin (cas a) ou l'oligonucléotide boucle (cas x) peuvent être modifiés chimiquement de manière à

être relié covalamment à un ou plusieurs ligands de faible masse moléculaire.

5 Il peut s'agir par exemple de molécules fluorescentes, de marqueurs comme la biotine, ou de peptides. La liaison d'un peptide peut être effectuée directement sur une base, par exemple en utilisant une thymine portant un groupement amino en position 5 et un agent de liaison bifonctionnel, comme le N-
10 hydroxysuccinimide ester de l'acide 4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylique (SMCC).

De manière générale, l'oligonucléotide simple brin se lie à la séquence cible d'acide nucléique et s'enroule autour du
15 double brin constitué, le cas échéant, comme indiqué plus haut, par un ADN en double hélice.

On observera que l'oligonucléotide peut se fixer simultanément sur deux séquences en double brin portées par deux
20 acides nucléiques différents, notamment deux ADN différents, qui peuvent être en double hélice, et par exemple des plasmides.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la fixation de la partie centrale sur une séquence cible d'ADN en double
25 hélice conduit à la formation d'une triple hélice.

La séquence cible sur l'ADN double brin est alors avantageusement une séquence oligopurine oligopyrimidine.

30 La liaison de l'oligonucléotide à l'acide nucléique en double brin, notamment la formation d'une triple hélice, peut être induite en ajoutant au milieu réactionnel un ligand de faible poids moléculaire.

En diminuant la quantité de ligand, ou même en supprimant le ligand, il est possible de désolidariser l'anneau de sa cible et de contrôler son mouvement le long de la cible.

5

Dans un mode préféré de l'invention, l'oligonucléotide se fixe au niveau d'une séquence oligopurine de la cible.

La liaison de l'oligonucléotide peut se faire
10 parallèlement au brin oligopurine de la séquence oligopurine.oligopyrimidine ou, en variante, antiparallèlement par rapport au brin oligopurine de ladite séquence selon les triplets engagés.

15 La matrice oligonucléotidique sur laquelle vont s'hybrider les extrémités de l'oligonucléotide simple brin a) renferme 10 à 36 nucléotides. Les extrémités qui s'hybrident avec une telle matrice comportent alors généralement, chacune 5 à 18 nucléotides.

20

L'oligonucléotide boucle sur lequel va s'hybrider l'extrémité libre de l'oligonucléotide simple brin x) contient de 16 à 100 nucléotides. Les extrémités simple brin de ces deux oligonucléotides s'hybrident en formant une double hélice qui
25 comporte généralement de 4 à 40 pb.

Pour la réalisation de l'incubation, les conditions notamment de pH, température, force ionique, sont choisies de manière à obtenir la fixation recherchée.

30

De manière générale, on opère à un pH de 3 à 9, notamment de 4,5 à 8,5, en particulier de 6 à 8, avec ou sans chauffage.

5

Les étapes d'hybridation et de ligation, sont effectuées après l'étape d'incubation, dans un tampon identique ou différent de celui utilisé pour l'incubation.

10

La température dépend de l'agent de ligation utilisé.

15

Il peut s'agir d'une enzyme. On opérera alors avantageusement à une température de 16 à 45°C avec une ligase de *E.coli*, ou encore de 35 à 65°C avec une ligase thermostable comme celle commercialisée sous la marque Ampligase.

20

En variante, on utilise un agent chimique pour la circularisation de l'oligonucléotide. On citera par exemple le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), le bromure de cyanogène, ou le cyanoimidazole. Avec de tels agents, la ligation peut être effectuée à des températures inférieures à 10°C, notamment de l'ordre de 4°C.

25

En autre variante, on utilise un oligonucléotide 5'-iodo et 3'-phosphorothioate. La réaction de circularisation chimique est initiée lorsque ces extrémités sont juxtaposées, ce qui est obtenu par hybridation sur une matrice. Cette réaction peut être effectuée à des températures de 4 à 50°C, à des pH variant de 3 à 8.

30

Les concentrations ioniques peuvent varier de 0 à 20 mM environ, pour des ions tels que Mg^{++} , et de 0 à 1M pour des ions tels que Na^+ ou K^+ .

Ladite matrice oligonucléotidique, (cas a) ou ledit oligonucléotide boucle (cas b) sont ajoutés après l'incubation et juste avant l'addition de l'agent de ligation.

5

On observe que dans le cas x), deux réactions de ligation sont réalisées, l'oligonucléotide circulaire étant le résultat de la circularisation en chaîne de deux oligonucléotides.

10

Aux fins d'isolement de la structure complexe, on procède à l'inactivation de la ligase, et avantageusement à la purification du complexe. Cette étape de purification peut s'effectuer en chargeant l'échantillon sur un gel, par exemple un gel d'agarose 1%, par chromatographie, colonne d'exclusion, ou à l'aide de billes, en utilisant éventuellement un récepteur pour un ligand fixé sur l'oligonucléotide simple brin, l'oligonucléotide boucle ou l'oligonucléotide matrice.

20

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les structures intermédiaires et les structures circularisées formées.

25

Entrent ainsi dans le champ de l'invention des structures intermédiaires d'acides nucléiques caractérisées en ce qu'elles comprennent un oligonucléotide simple brin tel que défini plus haut, fixé par liaisons réversibles sur la séquence cible d'acide nucléique.

30

Plus spécialement, l'invention vise de telles structures dans lesquelles la cible d'acide nucléique est un ADN en double hélice, et notamment un plasmide, en particulier un plasmide surenroulé.

Dans de telles structures, l'oligonucléotide est fixé à la cible d'acide nucléique, enroulé autour de cette cible.

5 En particulier, l'oligonucléotide est fixé à un ADN en double hélice et forme une triple hélice.

Dans une telle structure, la séquence cible de l'ADN double brin est avantageusement une séquence
10 oligopurine.oligopyrimidine.

Ces structures comprennent notamment une séquence à 10 à 25 triplets, formée par la séquence oligopurine-oligopyrimidine de la cible sur laquelle est fixée
15 l'oligonucléotide.

Dans ces triple hélices, l'oligonucléotide est fixé parallèlement au brin contenant la séquence oligopurine, les triplets formés étant par exemple T.A x T; C.G x C; C.G x G.

20 En variante, l'oligonucléotide est fixé antiparallèlement par rapport à la séquence oligopurine, les triplets formés étant T.A x T ; T.A x A ; C.G x G.

25 Dans d'autres structures selon l'invention, l'oligonucléotide se fixe simultanément sur deux séquences d'acides nucléiques différentes, portées par deux acides nucléiques différents, notamment deux ADN en double hélice, en particulier deux plasmides.

30 Dans encore d'autres structures intermédiaires, les 2 extrémités de l'oligonucléotide sont en outre hybridées sur la matrice oligonucléotidique et avantageusement reliées

enzymatiquement ou chimiquement. Les structures correspondantes comportent donc une séquence à triplets impliquant l'acide nucléique cible, reliée de chaque côté, par des séquences
5 espaceurs, à une séquence à doublets impliquant la matrice oligonucléotidique.

Des structures avantageuses comportent d'une part une cible comportant 10 à 25 triplets et d'autre part une matrice
10 comportant 10 à 36 doublets, de préférence de 14 à 20.

Dans d'autres structures intermédiaires, les deux extrémités de l'oligonucléotide sont hybridées l'une à l'autre et avantageusement reliées enzymatiquement ou chimiquement aux
15 deux extrémités d'un oligonucléotide boucle. Les structures correspondantes comportent donc une séquence à triplets impliquant l'acide nucléique cible, relié de chaque côté, par des séquences espaceurs, à une séquence en structure tige-boucle (ou épingle à cheveux).

20

L'invention vise notamment les structures telles que définies ci-dessus mais libérées de la matrice, comprenant un acide nucléique double brin encerclé par un anneau formé par un oligonucléotide simple brin.

25

Dans les structures circularisées obtenues l'anneau est fixé de façon non covalente à la cible d'acide nucléique. En variante, il est libre de se déplacer le long de l'acide nucléique cible. Comme indiqué plus haut, le mouvement de
30 l'anneau par rapport à la cible peut être contrôlé par addition ou suppression d'un ligand spécifique du complexe formé entre la séquence de l'oligonucléotide impliquée dans la liaison et celle de la cible.

Dans ces différentes structures, l'oligonucléotide peut contenir des liaisons autres que phosphodiester, ou être chimiquement lié à d'autres molécules, comme défini plus haut.

5

On observe également que dans le cas x), le même oligonucléotide boucle, modifié ou non, peut être utilisé pour des oligonucléotides monobrin de séquences différentes, et donc pour des cibles différentes.

10

Comme indiqué ci-dessus en rapport avec le procédé, la cible est avantageusement de l'ADN en double hélice. En particulier, la cible est un plasmide linéaire ou circulaire, notamment un plasmide circulaire surenroulé. La structure correspondante est alors constituée de 2 molécules d'ADN

15 circulaires, l'une en double brin, l'autre en simple brin, qui sont accrochées l'une à l'autre et peuvent être séparées, si on le souhaite, par rupture d'une liaison covalente.

20

Dans les structures où l'oligonucléotide est fixé simultanément sur deux séquences différentes d'acides nucléiques, portées par exemple par deux plasmides différents, les deux plasmides sont reliés après la circularisation de manière covalente.

25

On observera que l'oligonucléotide simple brin circularisé autour de l'acide nucléique double brin permet le marquage de cet acide nucléique et constitue ainsi un outil de grand intérêt pour des applications de détection ou pour la

30 purification des acides nucléiques.

L'invention vise donc l'application du procédé de circularisation défini plus haut pour le marquage ou la

détection d'acides nucléiques en double brin, notamment de plasmides, comprenant l'utilisation d'un oligonucléotide monobrin (cas a) ou boucle (cas x) relié covalamment ou non à
5 une molécule d'intérêt. La liaison non-covalente peut être obtenue par exemple par l'utilisation d'un oligonucléotide biotinylé qui interagit fortement avec une molécule d'avidine ou de streptavidine reliée à une molécule d'intérêt.

10 Un tel marquage, qui ne nécessite aucune modification chimique ou enzymatique de la cible, est particulièrement intéressant dans le cas de plasmides et plus spécialement de plasmides surenroulés.

15 Le marquage peut être radioactif ou chimique, par exemple en utilisant des groupements fluorescents.

L'intensité du marquage peut être améliorée par utilisation d'anticorps anti-streptavidine couplés à la biotine,
20 suivi d'une deuxième couche de streptavidine-fluorescéine.

Alternativement, le marquage peut être effectué par l'intermédiaire d'une autre molécule d'acide nucléique capable de s'hybrider avec l'oligonucléotide simple brin.

25

La détection peut être également réalisée par un mécanisme de répllication en boucle qui permet d'amplifier la séquence de l'oligonucléotide circulaire simple brin.

30

Des structures circularisées réalisées avec de tels oligonucléotides permettent avantageusement de dénombrer les plasmides dans les cellules, même présents en faible nombre, ce qui constitue un avantage par rapport aux techniques FISH qui ne

permettent la mesure d'une efficacité de transfection que lorsque le plasmide est présent avec un nombre de copies très élevé.

5

Elles permettent également de différencier deux séquences différant par seulement 1 ou 2 mutations, en détectant l'oligonucléotide fixé sur l'une de ces deux séquences grâce à la molécule portée par cet oligonucléotide ou par un procédé de
10 répllication en boucle.

Selon une autre application, on notera que le procédé de circularisation selon l'invention peut être mis en oeuvre pour sélectionner, par exemple parmi des séquences d'acides
15 nucléiques simple brin dégénérées, des séquences d'acides nucléiques capables de se fixer sur un acide nucléique en double brin, ou encore des séquences capables de favoriser la pénétration d'acides nucléiques en double brin dans des cellules, ou le ciblage de ces acides nucléiques vers des
20 compartiments cellulaires spécifiques, en particulier vers le noyau.

Grâce à ce procédé, on forme en effet des structures où l'oligonucléotide est fixé de manière irréversible à sa cible,
25 qui peuvent être isolées, par exemple, par chromatographie, purification sur gel, colonnes d'exclusion. En utilisant des oligonucléotides contenant une séquence partiellement aléatoire, il est possible d'isoler et, si on le souhaite, d'amplifier les séquences qui confèrent à l'oligonucléotide la capacité de se
30 fixer sur la cible d'acide nucléique en s'enroulant autour de lui.

L'invention vise ainsi l'application du procédé de circularisation défini ci-dessus pour la purification d'acides nucléiques double-brin, notamment de plasmides, comprenant
5 l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin ou d'un oligonucléotide boucle relié covalamment à une molécule qui peut interagir avec une autre molécule attachée à un support solide, notamment une colonne d'affinité.

10 Une telle purification peut être également réalisée en utilisant un oligonucléotide simple brin circularisé autour d'un plasmide et une matrice reliée covalamment à une molécule qui peut interagir avec une autre molécule attachée à un support solide, notamment une colonne d'affinité.

15

L'invention vise également les applications desdites structures, notamment en détection et en thérapie génique.

Conformément à l'invention, l'oligonucléotide simple
20 brin peut comporter un résidu de composé chimique choisi pour améliorer par exemple des protocoles de purification de plasmides, la délivrance intracellulaire de plasmides vers un compartiment cellulaire spécifique (noyau, mitochondries, par exemple), ou le ciblage dans des applications de thérapie
25 génique.

Il est ainsi possible de vectoriser des acides nucléiques double brin, avantageusement des ADN, et en particulier des plasmides, à l'aide de structures dans
30 lesquelles l'oligonucléotide simple brin est couplé, de manière covalente ou non-covalente, à des molécules susceptibles de favoriser sa pénétration à travers la membrane cellulaire et/ou nucléaire. On citera notamment, pour le ciblage nucléaire, des

peptides correspondant à la séquence de localisation nucléaire (NLS) du produit du grand antigène T du virus SV40 (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val) ou des molécules synthétiques d'une nature
5 autre que peptidique, par exemple des glycoconjugués ou des fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN) qui peuvent être intégrés dans la séquence de l'oligonucléotide simple brin. Pour la pénétration cellulaire, on pourra utiliser des peptides possédant une propriété de translocation, par exemple un peptide
10 correspondant aux résidus 48 à 57 de la protéine TAT du VIH (Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg), ou un peptide correspondant aux résidus 43 à 58 de l'homéodomaine de la protéine Antennapedia (Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys). Pour le ciblage cellulaire, on
15 utilisera avantageusement des ligands de récepteurs membranaires, par exemple le TGF- α .

Des séquences dotées de ces propriétés peuvent être isolées par des expériences de sélection-amplification à partir
20 de minicercles contenant une séquence aléatoire.

La formation de structures triplex selon l'invention présente également un intérêt pour réprimer spécifiquement l'expression d'un gène. Cette répression peut être inductible,
25 notamment en utilisant un ligand spécifique des triple hélices. Il est ainsi possible d'éliminer l'expression du transgène en traitant les patients avec ledit ligand.

Ils permettent également de relier de manière
30 irréversible, 2 molécules différentes d'acide nucléique circulaire double brin, et notamment 2 plasmides différents, ce qui permet d'augmenter par exemple des rendements de co-

transformation de bactéries ou de co-transfection de cellules, en assurant la présence concomittante de 2 plasmides différents.

5 On notera que la formation de structures triplex de l'invention sont en outre utilisables pour effectuer des analyses génétiques par exemple pour détecter des mutations dans des échantillons cytologiques, ou encore pour étudier la distribution de certaines séquences.

10

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent. Dans la description de ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 17, qui représentent respectivement :

15

- la figure 1, un diagramme schématique du procédé de circularisation d'un oligonucléotide autour d'un plasmide et autour d'un ADN en double hélice,

20 - la figure 2, une séquence cible de la construction plasmidique pAR1 avec insertion du promoteur du récepteur aux androgènes (-146, +131), un oligonucléotide monobrin à circulariser et une matrice oligonucléotidique,

25 - la figure 3, les résultats d'essais montrant la formation d'une triple hélice,

- la figure 4, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, avec les produits de ligation et de clivage,

30

- la figure 5, une photo d'un gel non dénaturant montrant la dissociation de triple hélices en l'absence de magnésium,

- la figure 6, une séquence cible de la construction plasmidique pGA1, constituée de l'insertion d'un duplex synthétique entre les sites EcoR I et Pst I du plasmide pBluescript SK+ ,
5 commercialisé par Proméga, la séquence de la partie centrale de l'oligonucléotide à circulariser pour les constructions 2 et 3, et les ligands utilisés pour la construction 1,
- la figure 7, une photo d'un gel en conditions dénaturantes,
10 avec les produits de ligation et de clivage,
- la figure 8, une photo d'un gel d'électrophorèse en agarose, avec les produits de ligation, visualisé soit par éclairage avec une lampe UV en présence de bromure d'éthidium (à droite), soit
15 par autoradiographie après séchage du gel (à gauche), et
- la figure 9, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, avec les produits de ligation,
- 20 - la figure 10, une photo d'un gel d'électrophorèse en agarose, montrant le plasmide modifié ou non et les produits de diverses digestions enzymatiques, visualisé par éclairage avec une lampe UV en présence de bromure d'éthidium,
- 25 - la figure 11, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, avec les produits de ligation,
- la figure 12, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, avec les produits de ligation,
30
- la figure 13, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes, montrant que l'oligonucléotide circularisé autour du plasmide par une réaction chimique comigre avec ce

plasmide, et se dissocie ensuite de ce plasmide lorsque celui-ci est linéarisé et la triple hélice est déstabilisée,

- 5 - la figure 14, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes, montrant la présence de streptavidine fixée sur l'oligonucléotide circulaire après purification et digestion du plasmide,
- 10 - la figure 15, une séquence cible de la construction plasmidique pBluescript SK+, où la séquence de l'oligonucléotide monobrin dont la partie centrale se fixe en formant une triple-hélice et la séquence de l'oligonucléotide boucle 32 mères se circularise conjointement avec cet oligonucléotide, et
- 15 - la figure 16, une photo d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, avec les produits de ligation.
- la figure 17, une description du schéma réactionnel pour la
- 20 synthèse d'une conjugué peptide-oligonucléotide boucle.

Constructions de triple hélice 1, 2 et 3

Le schéma du procédé de circularisation utilisé dans

25 les exemples est donné sur la figure 1 dont l'examen montre la partie centrale (1) de l'oligonucléotide linéaire qui se lie au grand sillon d'une séquence spécifique à l'intérieur du plasmide (2) (partie gauche) ou d'un ADN double brin (3) (partie droite), pour former un complexe à triple hélice. Ses extrémités 5' et 3'

30 (4) et (5) s'hybrident l'une à côté de l'autre, à une matrice oligonucléotidique (6) et sont reliées par un agent de ligation (7) pour former un oligonucléotide circulaire (8) cadénassé à

l'ADN plasmidique (partie gauche) ou à un fragment d'ADN (partie droite)

5 Conformément à ce schéma, 3 types de triple hélices différents sont décrits.

.Construction 1, entre les sites BamH I et Xho I :

10 Cette construction est illustrée par la figure 2 qui représente le plasmide pAR1 construit par insertion du promoteur du récepteur androgène de souris (-146,+131) entre le site BamH I et Xho I du plasmide pBL-CAT (dans le plasmide pAR4, les paires de bases G.C. indiquées par un * ont été mutées en T.A.)
15 SEQ ID N° 1 représente la séquence -119, -70 du promoteur et SEQ ID N°2, la séquence complémentaire.

SEQ ID N°1 :

5'AGGGGAGAAAAGGAAAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGAGAGAAAGGAGGT 3'

20

SEQ ID N°2 :

5' ACCTCCTTTCTCTCTCCCCTCCCCTCCCCTCCCCTTTCCTTTTCTCCCCT 3'

25 La séquence d'ADN cible pour la formation de la triple hélice est localisée entre les positions -102 et -88 sur SEQ ID N° 1. Elle correspond à SEQ ID N° 4.

30 La figure 2 donne également la séquence complète de l'oligonucléotide 89 mère (SEQ ID N° 3) sur laquelle on a indiqué le site se fixant sur la cible ("site triplex") et qui correspond à SEQ ID N° 4, et la séquence de la matrice de 20 nucléotides (SEQ ID N° 5).

SEQ ID N°3 :

5'CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGGGGAGGGGAGGGTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC 3'

5

L'oligonucléotide 89 mère comporte

- une séquence centrale (SEQ ID N° 4) capable de former
une triple hélice :

10

SEQ ID N° 4 : GAGGGGAGGGGAGGG

- deux linkers reliant SEQ ID N° 4 à des séquences
terminales de dix bases chacune, situées aux extrémités, pouvant
15 former respectivement dix paires de bases avec la matrice de 20
nucléotides (SEQ ID N° 5),

SEQ ID N° 5 : CGACCGTACGGGATCCGAGC

20

On ajoute un groupe phosphate à l'extrémité 5' de
l'oligonucléotide pour l'étape suivante de circularisation
enzymatique. En utilisant ³²P-ATP, on obtient l'oligonucléotide
radiomarké.

25

La position du site de restriction pour BsiW 1 à
l'intérieur de la matrice oligonucléotidique de 20 pb est
également indiquée.

30

Deux autres séquences de matrice ont été utilisées, à
savoir

SEQ ID N°6, 36-mère:

5' GCTAGCGTCGACCGTACGGGATCCGAGCTCCACGTG 3'

SEQ ID N°7, 14-mère:

5' CCGTACGGGATCCG 3'

5 .Constructions 2 et 3, entre Hind III et Pst I :

La figure 6 comprend les séquences du duplex synthétique entre les sites EcoR I et Pst I (SEQ ID N°8 et SEQ ID N° 9) du plasmide pGA1.

10 SEQ ID N° 8 :

5'AGCTTCGTACGGCGCCCGAGTTAAGGGAGAAGAGGAAAGAGATTGAGCGAGCCCTAGGGACG
TCCCGGGCTAGCGAATTCCTGCA 3'

15 SEQ ID N°9 :

5'GGAATTCGCTAGCCCGGGACGTCCCTAGGGCTCGCTCAATCTCTTTCCTCTTCTCCCTTAAC
TCGGGCGCCGTACAG 3'

20 La séquence cible est une séquence
oligopurine.oligopyrimidine de 20 pb (SEQ ID N° 10).

SEQ ID N°10: 5'AAGGGAGAAGAGGAAAGAGA 3'

25 Deux types d'oligonucléotides ont été élaborés de
manière à pouvoir être circularisés autour de cette séquence
cible.

.Construction 2 :

30 Ceux de la construction 2 comportent une partie
centrale de 18 nucléotides composée de G et de T
(SEQ ID N°11). Leur longueur totale peut varier de 43 à 89
nucléotides.

35 SEQ ID N°11 : 5' TGTTTGGTGTGTGGGTT 3'

Les oligonucléotides simple brin correspondants suivants ont été élaborés :

5 5' CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTGGTGTGTTGGGTTTTTTTTTTT
TTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC 3' (SEQ ID N°12, 89-mère),

5' CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTTTTTTTGTGTTGGTGTGTTGGGTTTTTTTTTTCACGTGGAGCT
CGGATCC3' (SEQ ID N°13, 69-mère),

10

5' CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTGTGTTGGTGTGTTGGGTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC3'
(SEQ ID N°14, 59 mère),

5' CGTACGGTCGACGTTTTGTGTTGGTGTGTTGGGTTTTGGAGCTCGGATCC3' (49-mère)

15 (SEQ ID N°15, 49-mère), et

5' CGTACGGTCGTTTTGTGTTGGTGTGTTGGGTTTTGCTCGGATCC3' (SEQ ID N°16,
43-mère)

20

.Construction 3 :

Les oligonucléotides de la construction 3 comportent une partie centrale de 15 nucléotides composée de T et de C (SEQ ID N°17).

25

SEQ ID N° 17 : 5' CTCTTCTCCTTTCTCT 3'

L'oligonucléotide simple brin répondant à la séquence suivante a été élaboré :

30 5' CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTCTCTTCTCCTTTCTCTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC
3' (SEQ ID N°18).

Exemple 1 : Analyse de la formation d'une triple hélice
par essai de co-migration

- 5 On vérifie la formation d'une triple hélice dans la première construction, entre l'oligonucléotide 89-mère et sa séquence cible sur le plasmide, en procédant à l'essai de co-migration suivant dont les résultats sont donnés sur la figure 3
- 10 - l'oligonucléotide 89-mère (10 fmol) est mis à incuber dans 10 μ l de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10mM, dithiothréitol 10 mM, ATP 1 mM, 25 μ g/ml d'albumine de sérum bovin, en l'absence de
- plasmide (piste 1 sur la figure 3), en présence de 60 fmol de
- 15 pAR1 surenroulé (piste 2), 60 fmol de pAR1 digéré par BamHI et Xho I (piste 3), et 60 fmol de pAR4 (piste 4).

Les échantillons sont chauffés à 75°C, puis refroidis à 37°C et chargés sur un gel de polyacrylamide à 6 %.

20

La migration est effectuée à 37°C dans un tampon TBE contenant 10 mM de $MgCl_2$.

25 La coloration du gel avec du bromure d'éthidium montre que le plasmide surenroulé pénètre entièrement dans le gel (piste 2) et la comparaison avec la mobilité électrophorétique de marqueurs de poids moléculaires indique que la bande de la piste 3 migre comme un duplex de 700 pb.

30 Lorsque l'oligonucléotide et le plasmide pAR1 sont incubés ensemble, l'oligonucléotide marqué migre en même temps que le plasmide. Cette migration ne se produit pas avec le plasmide pAR4, dans lequel la formation de la triple hélice ne

peut se produire par suite de 6 mutations de G en T dans la séquence cible (ces mutations sont représentées sur la figure 2, et désignées par un astérisque).

5

Lorsque pAR1 est digéré à la fois par Xho I et BamH I, l'oligonucléotide marqué migre en même temps que le fragment de 700 pb qui contient la séquence cible.

10

Exemple 2 : Analyse des produits de la ligation et du clivage par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes avec la construction 1

a - étude des produits de ligation

15

L'oligonucléotide marqué 89-mère est incubé comme décrit ci-dessus en rapport avec la figure 3 lorsqu'on utilise, comme ligase, pour l'étape ultérieure de ligation, l'ADN ligase du phage T4. Avec l'Ampligase, on utilise un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 25 mM, MgCl₂ 10mM, NAD 0,5mM, 0,01% Triton X100 et, avec la ligase de *E.coli*, un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10mM, DTT 10 mM, NAD 26 µM, albumine de sérum bovin 25 µg/ml.

25

La réaction de ligation est effectuée à 45°C, pendant 1 heure, en utilisant 40 U de T4 ADN ligase (New England, Biolabs). La réalisation de la réaction à cette température permet de réduire la formation de molécules de dimères linéaires qui se forment par suite de la ligation de deux oligonucléotides différents 89-mère s'hybridant à la matrice 20-mère. La ligase est inactivée par la chaleur pendant 15 minutes à 65°C avant traitement par des endonucléases de restriction.

30

Les résultats des différents essais sont donnés sur la figure 4. Dans les pistes 3 à 6 et 8, le plasmide est présent durant la réaction de ligation.

5

Dans la piste 7, le plasmide est ajouté après la circularisation de l'oligonucléotide 89-mère, suivie d'une dénaturation par la chaleur de l'ADN ligase, comme indiqué par l'astérisque. Les échantillons sont précipités par addition
10 d'éthanol et remis en suspension dans du formamide à 80 %, NaOH 10 mM, EDTA 1 mM comme tampon de charge.

Le mélange réactionnel est chauffé à 90°C pendant 5 minutes, puis chargé sur un gel de polyacrylamide dénaturant
15 à 6 %.

On constate à l'examen de la figure 4 qu'en présence de la matrice de 20 oligonucléotides, l'oligonucléotide linéaire 89-mère est transformé en une molécule circulaire. La vitesse de
20 migration dans un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % apparaît plus faible.

Comme indiqué ci-dessus, la ligation est également effectuée en présence du plasmide pAR1, dans des conditions
25 permettant la formation de la triple hélice.

L'oligonucléotide marqué est transformé en une espèce ayant une très faible vitesse de migration, similaire à celle du plasmide lui-même, comme le révèle la coloration au bromure
30 d'éthidium (figure 4, piste 4).

La nature de cette espèce a été identifiée selon deux approches différentes.

b - étude des produits de clivage

L'échantillon a été traité avec l'endonucléase de
5 restriction Xho I, ce qui permet de linéariser le plasmide pAR1.

Ce traitement libère l'oligonucléotide circulaire comme
le montre la mobilité électrophorétique (figure 4, piste 6).

10 En variante, l'échantillon a été traité avec
l'endonucléase de restriction BsiW I. Cet enzyme ne clive pas
pAR1, mais peut cliver l'oligonucléotide circulaire en présence
de la matrice de 20 oligonucléotide.

15 Le produit de clivage migre exactement comme
l'oligonucléotide linéaire de 89 mères (figure 4, piste 5).

L'espèce à faible migration ne peut pas être détectée
dans les essais suivants :

20

- lorsqu'on utilise, à la place de pAR1, pAR4 qui ne forme pas
de triplex avec l'oligonucléotide de 89 mères (piste 8),

- lorsqu'on ajoute le plasmide pAR1 après la circularisation de
25 l'oligonucléotide de 89 mères et la dénaturation par la chaleur
de la T4 ADN ligase (piste 7), et également

- lorsqu'on utilise pour la circularisation un autre
oligonucléotide linéaire qui ne peut pas former de triple
30 hélice.

Ces expériences montrent que l'oligonucléotide a été circularisé autour de la cible d'ADN double brin et par conséquent a été cadénassé au plasmide.

5

Les deux molécules restent associées dans des conditions fortement dénaturantes et ne peuvent être séparées qu'en rompant les liaisons chimiques.

10

Toutefois dans ce complexe, l'oligonucléotide circulaire, capable de former une triple hélice, peut diffuser dans une dimension le long de la double hélice.

15

Exemple 3 : Dissociation des triple hélices en l'absence de magnésium dans un gel non dénaturant

Les échantillons sont préparés comme décrits ci-dessus en présence de magnésium et chargés sur un gel de polyacrylamide à 6 % dépourvu de magnésium.

20

La migration est réalisée à 37°C dans un tampon TBE en l'absence de $MgCl_2$.

25

Les résultats des essais sont donnés sur la figure 5.

On ne détecte pas de formation de triple hélice entre l'oligonucléotide de 89 mères linéaire et le plasmide pAR1 lorsqu'on fait migrer les échantillons incubés dans un tampon contenant du magnésium dans un gel non dénaturant, sans magnésium. (figure 5, piste 2).

30

L'oligonucléotide radiomarké ne reste associé avec le plasmide que lorsqu'il a été circularisé en présence du plasmide et de magnésium avant de charger le gel (piste 4).

5

Lorsque le plasmide est digéré par Xho I, l'oligonucléotide circulaire reste associé au plasmide linéaire lorsque le gel contient du magnésium, mais se dissocie en l'absence de magnésium, bien que le site de clivage soit
10 localisé à 200 pb du site cible de la triple hélice.

Dans la piste 6, le plasmide est ajouté après circularisation de l'oligonucléotide de 89 mères, suivie d'une dénaturation par la chaleur de l'ADN ligase.

15

L'absence de magnésium (ou de tout autre cation divalent) apparaît donc suffisante pour empêcher la formation de la triple hélice et permettre à l'oligonucléotide circulaire de se déplacer autour du plasmide.

20

D'autres stratégies peuvent être utilisées pour marquer le plasmide de manière à perdre l'interaction de la triple hélice après la ligation, par exemple en formant une triple hélice induite par un ligand ou une valeur donnée de pH.

25

Exemple 4 :Analyse des produits de ligation et de clivage par électrophorèse sur gel , en conditions dénaturantes avec la construction 2

30

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 7.

L'oligonucléotide, qui peut être un 59-mère (pistes 1 à 6), un 69-mère (pistes 7 à 12), ou un 89-mère (pistes 13 à 18) (10fmol) est mis à incuber dans le milieu décrit en rapport avec

5

la figure 3 dans l'exemple 2, en l'absence de plasmide (pistes 1,2,7,8,13,14), en présence de pGA1 (1µg) (pistes 4,5,6,10,11,12,16,17,18), ou en présence de plasmide pBluescript qui ne contient pas la cible pour la formation de la triple
10 hélice (1µg) (pistes 3,9 et 15) et dans certains cas en présence de ligand SD46 (4µM) (pistes 3,5,6,9,11,12,15,17,18). Les échantillons sont chauffés à 70°C, puis refroidis à 37°C. La réaction de circularisation est effectuée à 37°C pendant 1h, en utilisant 40 U de T4 ADN ligase. La matrice n'a pas été ajoutée
15 dans les pistes 1,7 et 13. La ligase est inactivée par la chaleur. 10 µl d'une solution de formamide contenant des colorants de charge sont alors directement ajoutés aux échantillons. Le mélange réactionnel est chauffé à 90°C pendant 5 min, puis chargé sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 5%.

20

On constate à l'examen de la figure 7 que, en présence de la matrice de 20 nucléotides, les oligonucléotides de 59, 69 et 89-mère sont transformés en des molécules circulaires de migration plus faible. L'apparition de produits de migration
25 très lente n'est observée que si l'oligonucléotide a été préalablement incubé avec le plasmide pGA1 contenant la séquence cible et le ligand SD46. Cette espèce a été traitée avec l'endonucléase de restriction Hind III, ce qui permet de linéariser le plasmide pGA1. Ce traitement libère
30 l'oligonucléotide circulaire. Ces expériences démontrent que les oligonucléotides ont été circularisées autour du plasmide par formation d'une triple hélice inductible par le ligand SD46.

Exemple 5: Radiomarquage d'un plasmide surenroulé à l'aide de l'oligonucléotide 89-mère

5 Les résultats sont donnés sur la figure 8.

L'oligonucléotide 89-mère est incubé comme indiqué ci-dessus, en présence de plasmide pGA1 (1 μ g) (pistes 1,2,4 et 5) ou pBluescript (pistes 3 et 6), en présence de 2 μ M de ligand SD27 (pistes 1 à 3) ou SD46 (pistes 4 à 6). Dans les pistes 1 et 10 4, la matrice est omise. Après réaction de circularisation et inactivation de la ligase, 2 μ l de glycérol ont été ajoutés aux échantillons qui ont été chargés sur un gel d'agarose 1% et migré pendant 30 min à 50V dans du tampon TBE. Le gel a été visualisé sous lampe UV. La présence de bromure d'éthidium dans 15 le gel révèle la présence de plasmide surenroulé dans l'ensemble des puits (à droite) (les puits 7 et 8 contiennent respectivement les plasmides pBluescript et pGA1 n'ayant subi aucun traitement). Le gel a été ensuite séché et autoradiographié. Un signal radioactif important est détecté au 20 niveau du plasmide lorsque la circularisation a été effectuée en présence de pGA1 et de ligand SD27 ou SD46. Cette expérience démontre que l'état topologique du plasmide n'est pas affecté par les traitements effectués et qu'un oligonucléotide radiomarké cadencé à un plasmide permet de radiomarker ce 25 plasmide.

Exemple 6 : Analyse des produits de ligation par électrophorèse sur gel , en conditions dénaturantes avec la construction 3

30

Les résultats sont donnés sur la figure 9.

L'oligonucléotide 59-mère (10 fmol) est mis à incubé dans 10 μ l de MES 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 20 mM, DTT 3 mM, ATP 1

mM, en l'absence de plasmide (pistes 1 et 2), en présence de pGA1 (5 µg) (piste 4) ou pBluescript (piste 3). Les échantillons sont chauffés à 70°C, puis refroidis à 4°C. Après 14 h environ, la réaction de circularisation est effectuée à température ambiante, pendant 2 h, en utilisant 40 U de T4 ADN ligase. La ligase est inactivée par la chaleur. 10 µl d'une solution de formamide contenant des colorants de charge sont alors directement ajoutés aux échantillons. Le mélange réactionnel est traité comme indiqué plus haut avec la figure 4. Dans ces conditions, l'oligonucléotide peut être circularisé par l'ADN ligase du phage T4 (piste 2). Il est circularisé autour du plasmide lorsque celui-ci contient la séquence cible pour la formation de la triple hélice (puits 4).

Exemple 7: Circularisation d'un oligonucléotide autour d'un plasmide avec des séquences triple-hélice et des oligonucléotides de longueur différente

On rapporte ci-après d'autres séquences d'oligonucléotides simple brin élaborés de manière à pouvoir être circularisés autour de la séquence cible de la construction 2, et comportant une partie centrale composée de G et de T pouvant être plus courte que celle utilisée dans les oligonucléotides décrits précédemment (SEQ ID N°11, 18 nucléotides). Ainsi cette partie centrale peut être de 14 nucléotides (SEQ ID N°19) pour l'oligonucléotide 57-mère (SEQ ID N°21) ou même 12 nucléotides (SEQ ID N°20) pour les oligonucléotides 54-mère (SEQ ID N°22), 43-mère (SEQ ID N°23), 33-mère (SEQ ID N°24). Leur longueur varie de 31 à 57 nucléotides, et des espaceurs de type hexaéthylèneglycol peuvent être inclus dans la séquence.

SEQ ID N°19:

GTTTGGGTGTTGTG

5 SEQ ID N°20:

GTGTTGTGGGTT

SEQ ID N°21:

CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTGTGTTGGGTGTTGTGTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC

10

SEQ ID N°22:

CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTGTGTTGTGGGTTTTTCACGTGGAGCTCGGATCC

SEQ ID N°23:

15 CGTACGGTCGTTTTTTGTGTTGTGGGTTTTTTTGCTCGGATCC

SEQ ID N°24:

CGTACGGTCGTXGTGTTGTGGGTTXGCTCGGATCC

(X est un espaceur hexaéthylèneglycol)

20

Les oligonucléotides SEQ ID N°21, 22, 23 et 24 peuvent être circularisés autour de leur cible portée par le plasmide pGA1.

25 Exemple 8 : Dissociation des triple-hélices lorsqu'on extrait le ligand spécifique des triple-hélices avec un oligonucléotide piège formant une triple-hélice intramoléculaire: analyse de la mobilité de l'oligonucléotide circulaire le long du plasmide.

30

Dans cet exemple, on utilise un oligonucléotide piège (SEQ ID N°25), capable de former une triple hélice intramoléculaire,

afin de capturer le ligand intercalé dans les triple-hélices, et
35 ainsi de les déstabiliser.

SEQ ID N°25

CTTTCCTTCTCTCCTTTTTGGAGAGAAGGAAAGTTTTTGTGTTGGTTGTGTGG

5 Pour ces expériences, on utilise le plasmide pGA2 qui est dérivé du plasmide pGA1 par introduction de deux mutations qui font apparaître un site de restriction unique pour l'enzyme Bgl II. Ce site recouvre partiellement le site de fixation des oligonucléotides formant des triple-hélices, représenté par un
10 trait noir (figure 10). La formation d'une triple hélice inhibe la coupure par cette enzyme de restriction.

 Les échantillons sont préparés de la façon suivante. L'oligonucléotide 59 mère (SEQ ID n°14) (1 μ M), est mis à
15 incuber dans le tampon T4 ADN ligase (50 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH=7.5), en présence de plasmide pGA2 (1 μ g dans 10 μ l) et d'un ligand spécifique des triple-hélices, le BQQ (20 μ M). Les échantillons sont chauffés à 75°C, puis refroidis doucement à 37°C. La réaction de circularisation est
20 effectuée pendant 1 h à 37°C, en ajoutant 3 μ M de matrice et 20u de T4 ADN ligase. La ligase est inactivée par la chaleur. 2 μ l de cette solution sont dilués dans 40 μ l de tampon de réaction pour l'endonucléase de restriction Bgl II (50 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH=7.9), puis 10 u de Bgl II sont
25 ajoutées. La réaction est arrêtée après 20 minutes par ajout de 5 μ L d'une solution SDS 1% - EDTA 0,4 M. Les échantillons sont alors précipités à l'éthanol et chargés sur un gel d'agarose 1% migré dans un tampon 0.5x TBE.

30 Les résultats des essais sont donnés sur la figure 10. Le puits 1 montre le plasmide surenroulé pGA2, dont le profil de migration révèle le plasmide surenroulé (sc) avec la présence d'une petite quantité de plasmide relaché (oc). Le puits 2

montre le plasmide pGA2 linéarisé (1) après coupure par l'enzyme Bgl II. La réaction de circularisation telle que décrite ci-dessus a été effectuée dans les puits 3 à 8. Les puits 9 à 14 ont subi le même traitement, mais la matrice et la ligase n'ont pas été ajoutées. Les puits 4, 5, 7, 10, 11 et 13 ont été traités par l'enzyme Bgl II (B), les puits 8 et 14 par l'enzyme Hind III (H). Dans les puits 5, 6, 7, 11, 12 et 13, l'oligonucléotide piège (TRAP) (SEQ ID N°25) a été ajouté. Dans les puits 6, 7, 12 et 13, on a ajouté le ligand SD46 après l'oligonucléotide piège. On constate à l'examen de cette figure que lorsque la réaction de circularisation a été effectuée, la coupure par l'enzyme de restriction Bgl II est inhibée (puits 4), alors que la coupure par Hind III n'est pas inhibée (puits 8). Lorsqu'on ajoute un oligonucléotide piège, la coupure par Bgl II est à nouveau observée (puits 5). Enfin, si l'on ajoute SD46 (voir figure 6), la coupure par Bgl II est à nouveau inhibée (puits 7). La coupure par l'enzyme Bgl II n'est jamais inhibée en absence de circularisation (puits 10, 11, 13, 14).

20

Ces résultats démontrent que l'oligonucléotide circulaire forme une triple hélice plus stable que l'oligonucléotide linéaire et reste fixé sur sa cible après dilution, ce qui aboutit à l'inhibition de la coupure enzymatique. Il est possible de dissocier ce complexe en ajoutant un oligonucléotide piège, ce qui se traduit par la restauration de la coupure par l'enzyme de restriction. Après cette dissociation, l'ajout d'un nouveau ligand spécifique des triple hélices permet de repositionner l'oligonucléotide circulaire sur sa cible et d'inhiber à nouveau la coupure enzymatique.

30

.Constructions de triple hélice 4 et 5

La séquence cible utilisée dans les expériences données
5 ci-après est une séquence oligopurine.oligopyrimidine de 18

paires de bases (SEQ ID N°26 et son complémentaire SEQ ID N°27)
qui est présente dans l'origine de répllication du phage f1, et à
ce titre dans de nombreux plasmides couramment utilisés dans les
10 laboratoires de recherche, par exemple les plasmides pBluescript
(vendus par Stratagène), les plasmides de la famille pUC, les
plasmides de la famille pGFP (vendus par Clontech), les
plasmides de la famille pGL (vendus par Promega). Cette séquence
n'est pas présente dans le plasmide pBR322.

15

SEQ ID N°26

AGAAAGGAAGGGAAGAAA

SEQ ID N°27

TTTCTTCCCTTCCTTTCT

20

Deux types d'oligonucléotides ont été élaborés de
manière à pouvoir être circularisés autour de cette séquence
cible.

25

.Construction 4

Les oligonucléotides de la construction 4 comportent
une partie centrale composée de G et T (SEQ ID N°28). Ils
peuvent également porter une ou deux molécules de biotine
30 greffées en position 5 d'une thymine.

SEQ ID N°28

TTTGTTGGGTTGGTTTGT

Les oligonucléotides suivant ont été élaborés:

SEQ ID N°29

CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTTGTTGGGTTGGTTTGTTCACGTGGAGCTCGGATCC

5

SEQ ID N°30

CGTACGGTCGACGCXAGCTTTTTGTTGGGTTGGTTTGTTCACGTGGAGCTCGGATCC (X représente une thymine portant une biotine en position 5).

10

SEQ ID N°31

CGTACGGTCGACGCXAGCTTTTTGTTGGGTTGGTTTGTTCACGXGGAGCTCGGATCC (X représente une thymine portant une biotine en position 5).

Construction 5

15

Les oligonucléotides de la construction 5 comportent une partie centrale composée de C et T (SEQ ID N°32)

SEQ ID N°32

TCTTCCTTCCCTTCTTT

20

Les oligonucléotides suivants ont été élaborés:

SEQID N°33

CGTACGGTCGACGCTAGCTTTTCTTCCTTCCCTTCTTTTTTACGTGGAGCTCGGATCC

25

SEQID N°34

CGTACGGTCGACGTTTTGTTTGGTGTGTTGGGTTTTCTTCCTTCCCTTCTTTTTTGGAGCTCGGATCC

30

Exemple 9 : Analyse des produits de ligation par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, avec la construction 4.

On vérifie qu'il est possible de circulariser les oligonucléotides de la construction 4 autour des plasmides

35

pBluescript SK+ et pEGFPC1. Les résultats sont représentés sur la figure 11.

5 Les oligonucléotides de séquence SEQ ID N°29, SEQ ID N°30 et SEQ ID N°31 sont utilisés respectivement dans les puits 1 à 5, 6 à 10 et 11 à 15. Les oligonucléotides radiomarqués en 5' (10 nM) sont mis à incuber en absence de plasmide (puits 1, 2, 6, 7, 11 et 12), avec 1 µg de plasmide pBluescript (puits 3, 10 8 et 13), 1 µg de plasmide pEGFPC1 (puits 4, 9 et 14), ou 1 µg de plasmide pBR322 (puits 5, 10 et 15), dans un tampon d'incubation T4 ADN ligase en présence de 20 µM BQQ. Après avoir chauffé les échantillons à 65°C, puis refroidi jusqu'à 37°C, on rajoute l'oligonucléotide matrice 20-mère et 4u de T4 ADN 15 ligase. La réaction se fait à 45°C pendant 1 h.

On constate à l'examen de la figure 11 que, en présence de la matrice de 20 nucléotides, les oligonucléotides sont transformés en des molécules circulaires de migration plus 20 faible. L'apparition de produits de migration très lente est observée lorsque l'oligonucléotide a été préalablement incubé avec le plasmide pBluescript ou pEGFPC1, contenant la séquence cible. Elle n'est pas observée lorsque l'oligonucléotide est préincubé avec le plasmide pBR322 qui ne contient pas la 25 séquence cible. Ces expériences démontrent que les oligonucléotides de la construction 4 peuvent être circularisés autour de plasmides contenant l'origine de répllication du phage f1.

Exemple 10 : Analyse des produits de ligation par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, avec la construction 5.

5

On vérifie qu'il est possible de circulariser les oligonucléotides de la construction 5 autour du plasmide pBluescript SK+. Les résultats sont représentés sur la figure 12.

10

L'oligonucléotide 68-mère (SEQ ID N°34) phosphorylé en 5' et radiomarké (3.9 pmol) est mis à incuber avec 10 µg de plasmide pBluescript (5 pmol) (puits 3, 5, 6, 7 et 8) ou 10 µg de plasmide pBR322 (puits 4), dans un tampon d'incubation 20 mM Acétate d'ammonium pH=4.5, 20 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 1 mM ATP (volume d'incubation 7 µl). Après une incubation d'une nuit à température ambiante (20°C), on rajoute l'oligonucléotide matrice 20-mère (1 µl), puis 1 µl d'une solution 250 mM Tris pH=8.0 et 1 µl (4u) de T4 ADN ligase (puits 2, 3, 4, 5, 7, 8). La réaction se fait à température ambiante pendant 2 heures. La matrice n'a pas été ajoutée dans les puits 1 et 5. Dans le puits 7, on a ajouté de l'eau à la place de la solution de Tris. Dans le puits 8, on a réalisé l'incubation dans du tampon T4 ADN ligase.

25

On constate à l'examen de la figure 12 que, lorsque l'oligonucléotide a été préincubé à pH acide, la réaction de circularisation ne peut s'effectuer que si l'on ajoute la solution de Tris pH=8.0 (comparer puits 2 et 7). L'apparition de produits de migration très lente est observée si l'oligonucléotide a été préincubé à pH acide avec le plasmide pBluescript SK+. Elle n'est pas observée lorsque

30

l'oligonucléotide est préincubé avec le plasmide pBR322 qui ne contient pas la séquence cible.

5 Ces expériences démontrent qu'un oligonucléotide dont la partie centrale formant une triple hélice est composée de T et C peut être circularisé autour du plasmide dans des conditions de pH voisines de la neutralité à condition d'avoir préformé la triple hélice à pH acide.

10

Exemple 11 : Autre séquence utilisée pour circulariser un oligonucléotide autour d'un ADN en double-brin.

.Construction 6:

15

La séquence cible utilisée est une séquence oligopurine.oligopyrimidine de 23 paires de bases (SEQ ID N°35 pour la partie oligopurine) qui est présente dans le promoteur du gène de l'IGF1 murin. Dans les expériences rapportées ci-
20 après, cette séquence est portée par le plasmide p1711b/luc. Ce plasmide est construit par clonage de la séquence (-1711,+328) du gène IGF1 murin dans le plasmide pGL2 (Promega).

SEQ ID N° 35

25 AGAAGAGGGAGAGAGAGAGAAGG

L'oligonucléotide de la construction 6 comporte une partie centrale composée de G et T (SEQ ID N°36) capable de

30

former une triple hélice de 18 triplets de bases en se fixant sur la cible ci-dessus.

SEQ ID N° 36

GGTTGTGTGTGTGTGGGT

5 L'oligonucléotide monobrin (SEQ ID N°37) utilisé pour les expériences de circularisation est élaboré à partir de cette séquence de la même manière que l'oligonucléotide SEQ ID N° 14 est conçu à partir de la séquence SEQ ID N° 11.

10 SEQ ID N° 37

CGTACGGTCGACGCTAGCTTTGGTTGTGTGTGTGTGGGTTTCACGTGGAGCTCGGATCC

Des expériences ont montré que l'oligonucléotide SEQ ID N°37 peut être circularisé autour de sa cible portée par le
15 plasmide p1711b/luc.

.Constructions 7 et 8

La mise en oeuvre de la réaction chimique nécessite
20 l'utilisation d'un oligonucléotide 5'-iodo et 3'-phosphorothioate. Les oligonucléotides ayant une thymine 5'-iodo étant actuellement seuls disponibles, la séquence de la matrice a été modifiée.

25 SEQ ID N°38

GACCGTACGATATCGCGAGC

Deux types d'oligonucléotides ont été élaborés de manière à pouvoir être circularisés à l'aide d'une méthode chimique.

.Construction 7

L'oligonucléotide de la construction 7 comporte une
5 partie centrale composée de G et T (SEQ ID N°11) capable de se
fixer sur le plasmide pGA2 grace à la séquence cible SEQ ID
N°10.

10 SEQ ID N° 39

5'-Iodo-
TCGTACGGTCGACGCTAGTTTTGTTTGGTGTGTGGGTTTTTCACGTGGAGCTCGCGATA 3'-
phosphorothioate

15 .Construction 8

L'oligonucléotide de la construction 8 (SEQ ID N°40)
comporte une partie centrale composée de C et T (SEQ ID N°32)
capable de se fixer sur le plasmide pBluescript SK+ grace à la
20 séquence cible (SEQ ID N°26 et son complémentaire SEQ ID N°27).

SEQ ID N° 40

5'-Iodo-
TCGTACGGTCGACGCTAGTTTTCTTTCCTTCCCTTCTTTTTTCACGTGGAGCTCGCGATA 3'-
25 phosphorothioate

Exemple 12: Analyse des produits de ligation chimique
et de clivage par électrophorèse sur gel dans des conditions non
dénaturantes, avec la construction 7.

30

L'oligonucléotide 59-mère (SEQ ID N°39) (puits 2 à 10) a
été incubé avec 1 µg de plasmide pGA2 (puits 3, 4, 7 à 10) dans
un tampon d'incubation 50 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1

mm ATP, pH=7.5, en présence de 20 μ M BQQ. Après avoir chauffé les échantillons à 65°C, puis refroidi jusqu'à 37°C, on rajoute l'oligonucléotide matrice SEQ ID N° 37) radiomarké en 5'. La
5 réaction se fait à 37°C pendant 1 h, sauf dans les puits 4 et 5 (2 minutes). Ensuite, on digère par l'endonucléase de restriction Hind III (puits 9 et 10). Les échantillons des puits 8 et 10 sont chauffés en présence d'un oligonucléotide piège SEQ ID N°24. Le puits 1 montre la matrice radiomarkée seule.

10

Les résultats sont représentés sur la figure 13.

On constate à l'examen de la figure que la matrice ne s'hybride sur l'oligonucléotide 59-mère que lorsque l'incubation
15 est suffisamment longue. D'autres expériences de ligation

enzymatique ont montré que ceci est dû au fait que la matrice ne comigre avec le 59-mère que lorsque celui-ci a été circularisé. La formation d'un lien internucléosidique entre les extrémités
20 5'-iodo et 3'-phosphorothioate de l'oligonucléotide nécessite une incubation de 1 heure avec la matrice. Lorsque la circularisation est effectuée en présence du plasmide pGA2, une espèce qui migre très lentement dans le gel apparaît (puits 3, 7, 8 et 9). Lorsque cette espèce est digérée par Hind III, la
25 comigration de la matrice est encore observée (puits 9). Ceci révèle que la triple hélice formée par l'oligonucléotide circulaire et le plasmide linéaire ne se dissocie pas dans le gel. Cependant, en ajoutant un oligonucléotide piège (SEQ ID N°25), le BQQ est éliminé du complexe, ce qui a pour effet la
30 déstabilisation de la triple hélice et la libération d'un oligonucléotide circulaire (puits 10). Le même traitement effectué sur le plasmide non digéré ne permet pas cette libération (puits 9). Ces expériences démontrent que la

circularisation chimique de l'oligonucléotide autour du plasmide pGA2 aboutit bien à la formation d'un complexe caténé.

5 De la même manière, il a été démontré que l'oligonucléotide de la construction 8 (SEQ ID N°40) peut être circularisé autour du plasmide pBluescript SK+ dans le tampon acétate à pH 4.5 décrit dans l'exemple 10.

10 Exemple 13 : fixation de streptavidine à un plasmide portant un oligonucléotide biotinylé.

Les oligonucléotides 59-mère biotinylé (SEQ ID N°30) (puits 1 à 9) ou non biotinylé (SEQ ID N°29) (puits 10 à 12),
15 radiomarqués en 5', ont été circularisés comme décrit dans l'exemple 9, en absence (puits 3 et 4) ou en présence (puits 5 à 12) du plasmide pGA2. On a alors ajouté de la streptavidine (200 nM) dans les puits 2, 4, 6, 9, 11 et 12. Les complexes ont alors été précipités (puits 7, 8, 9 et 12) afin d'éliminer les
20 oligonucléotides qui ne sont pas circularisés autour du plasmide, puis éventuellement digérés par l'endonucléase de restriction Hind III (puits 8, 9 et 11).

La figure 14 résume les résultats obtenus. O désigne la
25 position de migration des oligonucléotides seuls. O-S désigne la position de migration des complexes oligonucléotides-streptavidine, et P la position de migration des plasmines. La complexation de streptavidine ralentit la migration de l'oligonucléotide linéaire (puits 2) ou circulaire (puits 4). La
30 précipitation permet d'éliminer les oligonucléotides qui ne sont pas liés au plasmide (puits 7). Après digestion par Hind III, on peut observer que l'oligonucléotide biotinylé circulaire est libéré du plasmide, seul (puits 8) ou lié à la streptavidine

(puits 9). Si l'oligonucléotide biotinylé radiomarqué est ajouté après précipitation d'un complexe formé avec le 59-mère non biotinylé en présence de streptavidine, la migration de cet
5 oligonucléotide n'est pas retardée (puits 12), ce qui démontre que la précipitation de la streptavidine est bien due à sa fixation sur l'oligonucléotide biotinylé attaché au plasmide.

Constructions de triple-hélices pour le système utilisant un
10 oligonucléotide boucle

Le principe du procédé de circularisation utilisé est donné sur la figure 15 dont l'examen révèle la partie centrale de l'oligonucléotide linéaire (1) qui peut se lier dans le grand
15 sillon d'une séquence spécifique à l'intérieur du plasmide (2) pour former un complexe en triple-hélice (3), et des extrémités 5' et 3' capables de s'hybrider l'une à l'autre en formant une courte double-hélice (4). Une extrémité dépasse de la courte séquence en double-brin par une séquence en simple brin (5).
20 Cette extrémité peut former un double-brin avec une séquence en simple-brin complémentaire (6) dépassant d'un oligonucléotide qui a une forme de boucle ou d'épingle à cheveux (7). La formation de ce double-brin aboutit à la juxtaposition des extrémités 5' et 3' des oligonucléotides monobrins et boucle.
25 Ces extrémités sont alors reliées par un agent de ligation pour former un oligonucleotide circulaire cadencé à l'ADN plasmidique ou à un fragment d'ADN. L'oligonucléotide boucle peut être modifié chimiquement de manière à porter par exemple une molécule de biotine, ou bien une fonction amine que l'on
30 peut utiliser pour relier covalamment un peptide à cet oligonucléotide.

Conformément à ce schéma, plusieurs types de triple-hélices différentes ont été réalisés

5 .Construction 9

Cette construction est illustrée sur la figure 15 qui représente la séquence cible située sur le plasmide pBluescript SK+ (SEQ ID N°26 et 27). La figure donne également la séquence complète de l'oligonucléotide 63 mère (SEQ ID N°41) sur lequel on a indiqué le site se fixant sur la cible ("site triplex") et qui correspond à SEQ ID N°28, et la séquence de l'oligonucléotide boucle de 32 nucléotides (SEQ ID N°42).

15 L'oligonucléotide 63 mère comporte :

- une séquence centrale capable de former une triple hélice,
- deux linkers reliant cette partie centrale à des séquences terminales, l'une (l'extrémité 3') de 6 nucléotides, l'autre (l'extrémité 5') de 12 nucléotides, situées aux extrémités, pouvant former 6 paires de bases en s'hybridant l'une à l'autre. L'extrémité 5' dépasse de cette courte séquence en double-brin sous la forme d'un simple-brin de 6 nucléotides. L'oligonucléotide est phosphorylé en 5' afin de permettre la ligation enzymatique.

SEO ID N°41

CATCGACCTAGTTCGACGCTAGCTTTTTGTTGGGTTGGTTTGTTTTCACGTGGAGCTACTAGG

30 L'oligonucléotide 32-mère comporte :

- deux séquences complémentaires qui forment un double-brin de 11 paires de bases, reliées entre elles par un linker de 4 nucléotides,

- une extrémité 5' phosphorylée en simple brin de 6 nucléotides complémentaire de celle de l'oligonucléotide 63-mère.

5 SEQ ID N°42

TCGATGTCCGGATTGGCTTTTGCCAATCCGGA

Une construction de structure analogue a été réalisée en utilisant comme séquence cible de la formation d'une triple
10 hélice celle des constructions 2 et 3 (SEQ ID N°10), en utilisant un oligonucléotide 63 mère (SEQ ID N°43) ou 73 mère (SEQ ID N°44) dont la partie centrale formant une triple hélice contient de G et des T (SEQ ID N°11).

15 SEQ ID N°43

CATCGACCTAGTTCGACGCTAGCTTTTGTTTGGTGTGTTGTGGGTTTTCACGTGGAGCTACTAGG

SEQ ID N°44

20 CATCGACCTAGTTCGACGCTAGCTTTTTTTTTTGTGTTGGTGTGTTGTGGGTTTTTTTTTTCACGTGGA
GCTACTAGG

Une autre construction de structure analogue a été réalisée en utilisant comme séquence cible de la formation d'une triple hélice celle des constructions 4 et 5 (SEQ ID N°26 et
25 27), en utilisant un oligonucléotide 63 mère (SEQ ID N°45) dont la partie centrale contient des uraciles et des thymine portant un groupement méthoxy en position 2' des riboses.

SEQ ID N°45

30 CATCGACCTAGTTCGACGCTAGCTTTUGUUUGGUUGGUUGUUUTTTCACGTGGAGCTACTAGG
(les nucléotides soulignés sont des 2'O-méthyl nucléotides)

Exemple 14 : Analyse des produits de ligation par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, avec la construction 9.

5

L'oligonucléotide 63-mère radiomarké (SEQ ID N°41) est incubé dans le tampon T4 ADN ligase, l'échantillon est chauffé à 80°C avant l'étape ultérieure de ligation utilisant l'ADN ligase du phage T4. La réaction de ligation est effectuée à 37°C, pendant une heure, en ajoutant l'oligonucléotide boucle et 40 u de T4 ADN ligase (New England Biolabs). La réaction est alors arrêtée par ajout d'un volume équivalent d'une solution de charge contenant du formamide à 80%, NaOH 10 mM et EDTA 1 mM. Le mélange réactionnel est chauffé à 90°C pendant 5 minutes, puis chargé sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 8%.

Les résultats des différents essais sont donnés sur la figure 16. Dans les pistes 3 et 4, les plasmides pBluescript SK+ et pEGFPC1, respectivement, sont présents dans la réaction de ligation. Dans la piste 1, l'oligonucléotide boucle n'est pas ajouté.

On constate à l'examen de la figure qu'en présence de l'oligonucléotide boucle de 32 nucléotides, l'oligonucléotide linéaire 63-mère est transformé en une molécule circulaire de 95 nucléotides. La bande intermédiaire de faible intensité correspond à un 95-mère linéaire, obtenu lorsqu'une seule des deux réactions de ligation est réalisée. Lorsque la réaction est effectuée en présence d'un plasmide contenant la séquence cible, dans des conditions permettant la formation de la triple hélice, l'oligonucléotide radiomarké est transformé en une espèce ayant

une très faible vitesse de migration, similaire à celle du plasmide lui-même.

5 Exemple 15 : Synthèse d'un conjugué peptide-
oligonucléotide boucle.

Un peptide NLS a été conjugué à un oligonucléotide-boucle par la réaction décrite à l'aide de la figure 17.

10 L'oligonucléotide (6 nmol) portant un groupement amino greffé en position 5 d'une thymine est repris dans 50 μ l d'une solution 100 mM Borate pH 8.5. On ajoute 50 μ l d'une solution à 30 mM de SMCC (catalogue Sigma) dans le DMF et on laisse incuber pendant 1h30. Ceci conduit à un conjugué oligonucléotide-maléimide

15 capable de réagir avec une cystéine portée par un peptide. Le SMCC en excès est éliminé par passage sur une colonne nick-spin (Amersham Pharmacia Biotech) pré-équilibrée avec du tampon PBS (GibcoBRL). On ajoute alors le peptide NLS (100 nmol) et on

20 laisse la réaction se dérouler pendant la nuit à température ambiante en agitant. Le produit de la réaction est purifié sur gel de polyacrylamide 12% dénaturant.

REVENDICATIONS

5 1/ Procédé de circularisation d'oligonucléotides autour d'un
acide nucléique en double brin, caractérisé en ce qu'il comprend
- l'incubation d'un acide nucléique double brin comprenant une
séquence cible, avec un oligonucléotide simple brin comprenant
une partie centrale capable de se fixer sur ladite séquence
10 cible, reliée par des séquences espaceurs à des séquences
terminales en 5' et 3', ces séquences étant

. soit a) complémentaires de la séquence d'une matrice
oligonucléotidique,

. soit x) partiellement complémentaires l'une de
15 l'autre, de manière à pouvoir s'hybrider l'une à l'autre en
formant un double brin tout en conservant une extrémité en
simple brin, laquelle est capable de s'hybrider à la séquence
terminale d'un autre oligonucléotide, dit oligonucléotide-
boucle, qui possède une structure en épingle à cheveux, avec une
20 partie en simple brin et une partie repliée qui forme un double
brin,

ladite étape d'incubation étant réalisée dans des conditions
permettant la fixation de l'oligonucléotide simple brin au
niveau de la séquence cible par formation de liaisons
25 réversibles, ce qui conduit à l'enroulement de l'oligonucléotide
autour de sa cible, et dans le cas x), après une étape de
chauffage, afin de permettre l'ouverture de l'oligonucléotide et
son enroulement autour de l'ADN cible avant réhybridation de ses
extrémités,

30

- la mise en contact dans le premier cas a) du complexe formé
avec ladite matrice oligonucléotidique, dans des conditions
permettant l'hybridation des extrémités 5' et 3', de manière

adjacente, à la matrice, et dans le cas x), la mise en contact du complexe formé avec ledit oligonucléotide-boucle, dans des conditions permettant, par l'hybridation des extrémités libres de l'oligonucléotide simple brin et de l'oligonucléotide-boucle, la juxtaposition des extrémités 5' et 3' de ces oligonucléotides,

- la ligation des extrémités hybridées, de manière à circulariser l'oligonucléotide, simple brin (cas a) ou l'oligonucléotide simple brin et l'oligonucléotide boucle (cas x), autour de l'acide nucléique double brin et, si on le souhaite,

- l'isolement de la structure circularisée, où l'acide nucléique cible est cadénassé par l'oligonucléotide circulaire, suivi le cas échéant de sa purification.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'acide nucléique mis en œuvre est un ADN en double hélice.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un plasmide, notamment un plasmide surenroulé.

4/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'oligonucléotide simple brin comporte plus de 20 nucléotides, en particulier de 20 à 300 nucléotides, notamment de 30 à 100, avec comme partie centrale, destinée à se lier à la cible d'acide nucléique, une séquence de 10 à 25 nucléotides.

5/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on utilise des oligonucléotides simple brin

dans lesquels l'enchaînement de bases nucléiques comporte des liaisons autres que des liaisons phosphodiester, comprenant des liaisons de type phosphorothiate, phosphoramidate, méthylphosphonate ou acide nucléique peptidique, ou des mélanges de ces liaisons ou, en variante, ces oligonuincléotides sont modifiés chimiquement au niveau des sucres ou au niveau des bases, ou sont reliés covalamment à un ou plusieurs ligands de faible masse moléculaire, ou comportent une ou plusieurs liaisons non-nucléosidiques.

6/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'oligonuincléotide simple brin se lie à la séquence cible d'acide nucléique et s'enroule autour du double brin d'acide nucléique constitué, le cas échéant, par un ADN en double hélice.

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fixation de l'oligonuincléotide simple brin s'effectue sur une séquence cible d'ADN en double hélice et conduit à la formation d'une triple hélice.

8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence cible sur l'ADN double brin est une séquence oligopurine.oligopyrimidine.

9/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison de l'oligonuincléotide sur l'acide nucléique en double brin, notamment la formation d'une triple hélice, est induite en ajoutant au milieu réactionnel un ligand de faible poids moléculaire.

- 10/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la matrice oligonucléotidique sur laquelle vont s'hybrider les extrémités de l'oligonucléotide simple brin (cas a) renferme 10 à 36 nucléotides ou que l'oligonucléotide boucle sur lequel va s'hybrider l'extrémité libre de l'oligonucléotide simple brin (cas x) contient de 16 à 100 nucléotides.
- 10 11/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape d'incubation de l'acide nucléique avec l'oligonucléotide est réalisée à un pH de 3 à 9, notamment de 4,5 à 8,5, en particulier de 6 à 8, avec ou sans chauffage.
- 15 12/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape d'hybridation et la ligation sont effectuées après l'étape d'incubation, dans un tampon identique ou différent de celui utilisé pour l'incubation.
- 20 13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les extrémités de l'oligonucléotide simple brin (cas a) ou simple brin et boucle (cas x) sont reliées par un procédé enzymatique.
- 25 14/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les extrémités de l'oligonucléotide simple brin (cas a) ou simple brin et boucle (cas x) sont reliées par un procédé chimique.
- 30 15/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'isolement et la

purification de la structure circularisée sont effectués sur gel, par chromatographie, colonne d'exclusion, ou à l'aide de billes, en utilisant éventuellement un récepteur pour un ligand
5 fixé sur l'oligonucléotide simple brin, l'oligonucléotide boucle ou l'oligonucléotide matrice.

16/ Structure complexe d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide simple brin tel que mis en
10 oeuvre dans le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, fixé par liaisons réversibles sur la séquence cible d'acide nucléique, notamment sur un ADN en double hélice.

17/ Structure selon la revendication 16, caractérisée en ce que,
15 l'oligonucléotide est fixé à la cible d'acide nucléique, enroulé autour de cette cible.

18/ Structure selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'oligonucléotide est fixé à un ADN en double hélice, en formant
20 une triple hélice.

19/ Structure selon la revendication 18, caractérisée en ce que la séquence cible de l'ADN double brin est une séquence oligopurine.oligopyrimidine.
25

20/ Structure selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence à 10 à 25 triplets, formée par la séquence oligopurine-oligopyrimidine de la cible sur laquelle est fixé l'oligonucléotide.
30

21/ Structure selon l'une quelconque des revendications 16 à 20, caractérisée en ce que les 2 extrémités de l'oligonucléotide sont hybridées, cas a) sur la matrice oligonucléotidique, ou cas

x) l'une à l'autre et également à l'oligonucléotide boucle, les extrémités juxtaposées des oligonucléotides étant le cas échéant reliées entre elles par voie enzymatique ou chimique.

5

22/ Structure complexe d'acides nucléiques comprenant un acide nucléique double brin encerclé par un anneau formé par un oligonucléotide simple brin, l'anneau étant le cas échéant libre de se déplacer le long de l'acide nucléique cible.

10

23/ Structure selon la revendication 22, caractérisée en ce que le mouvement de l'anneau est contrôlé par l'addition ou la suppression d'un ligand spécifique du complexe formé entre la séquence de l'oligonucléotide et celle de la séquence cible.

15

24/ Structure selon la revendication 22 ou 23, caractérisée en ce que l'acide nucléique est un ADN en double hélice, notamment un plasmide, en particulier un plasmide surenroulé.

20

25/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour le marquage ou la détection d'acides nucléiques en double brin, notamment de plasmides, comprenant l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin (cas a) ou d'un oligonucléotide boucle (cas x), relié covalamment ou non à une molécule d'intérêt, la liaison non covalente pouvant notamment être obtenue par l'intermédiaire de l'interaction biotine/streptavidine.

25

26/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la détection d'une séquence spécifique présente sur l'acide nucléique cible en double brin, comprenant l'utilisation de molécules couplées à

30

l'oligonucléotide simple brin (cas a) ou boucle (cas x), ou la mise en œuvre d'un procédé de réplication en boucle.

5 27/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour différencier deux séquences différant par seulement 1 ou 2 mutations, en détectant l'oligonucléotide circulaire fixé sur l'une de ces deux séquences grâce à la molécule portée par cet oligonucléotide ou
10 par un procédé de réplication en boucle.

28/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour sélectionner, par exemple parmi des séquences d'acides nucléiques simple brin
15 dégénérées, des séquences d'acides nucléiques capables de se fixer sur un acide nucléique double brin, et notamment des séquences capables de favoriser la pénétration d'acides nucléiques en double brin dans des cellules, ou le ciblage de ces acides nucléiques vers des compartiments cellulaires
20 spécifiques, en particulier vers le noyau.

29/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la purification d'acides nucléiques double-brin, notamment de plasmides,
25 comprenant l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin ou d'un oligonucléotide boucle relié covalamment à une molécule qui peut interagir avec une autre molécule attachée à un support solide, notamment une colonne d'affinité.

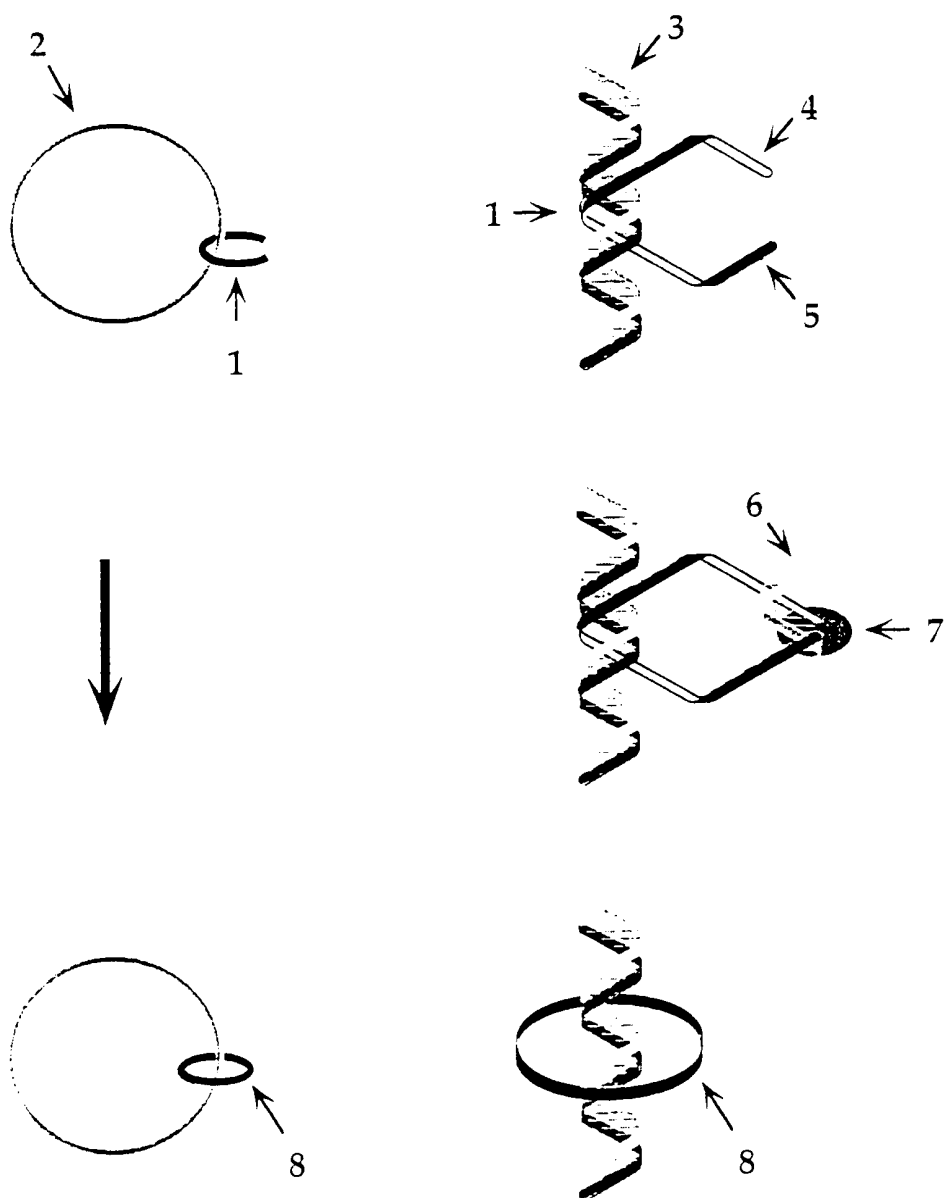
30 30/ Application du procédé de circularisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la purification d'acides nucléiques en double-brin, notamment de plasmides, comprenant l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin

circularisé autour d'un plasmide et d'une matrice reliée covalement à une molécule qui peut interagir avec une autre molécule attachée à un support solide, notamment une colonne
5 d'affinité.

31/ Application des structures selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, en thérapie génique, pour l'inhibition spécifique d'un gène porté par un acide nucléique en double
10 brin, en particulier par un plasmide, par fixation de l'oligonucléotide circulaire sur l'acide nucléique, et contrôle de cette fixation par des molécules de faible masse moléculaire, notamment par un ligand spécifique des triple hélices.

15 32/ Application des structures selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, dans laquelle l'oligonucléotide simple brin (cas a) ou l'oligonucléotide boucle (cas x) est couplé de façon covalente ou non covalente à une molécule permettant de faire pénétrer un acide nucléique dans une cellule, ou encore
20 permettant le ciblage de la structure vers un compartiment cellulaire et/ou nucléaire.

FIGURE 1



2/18

FIGURE 2

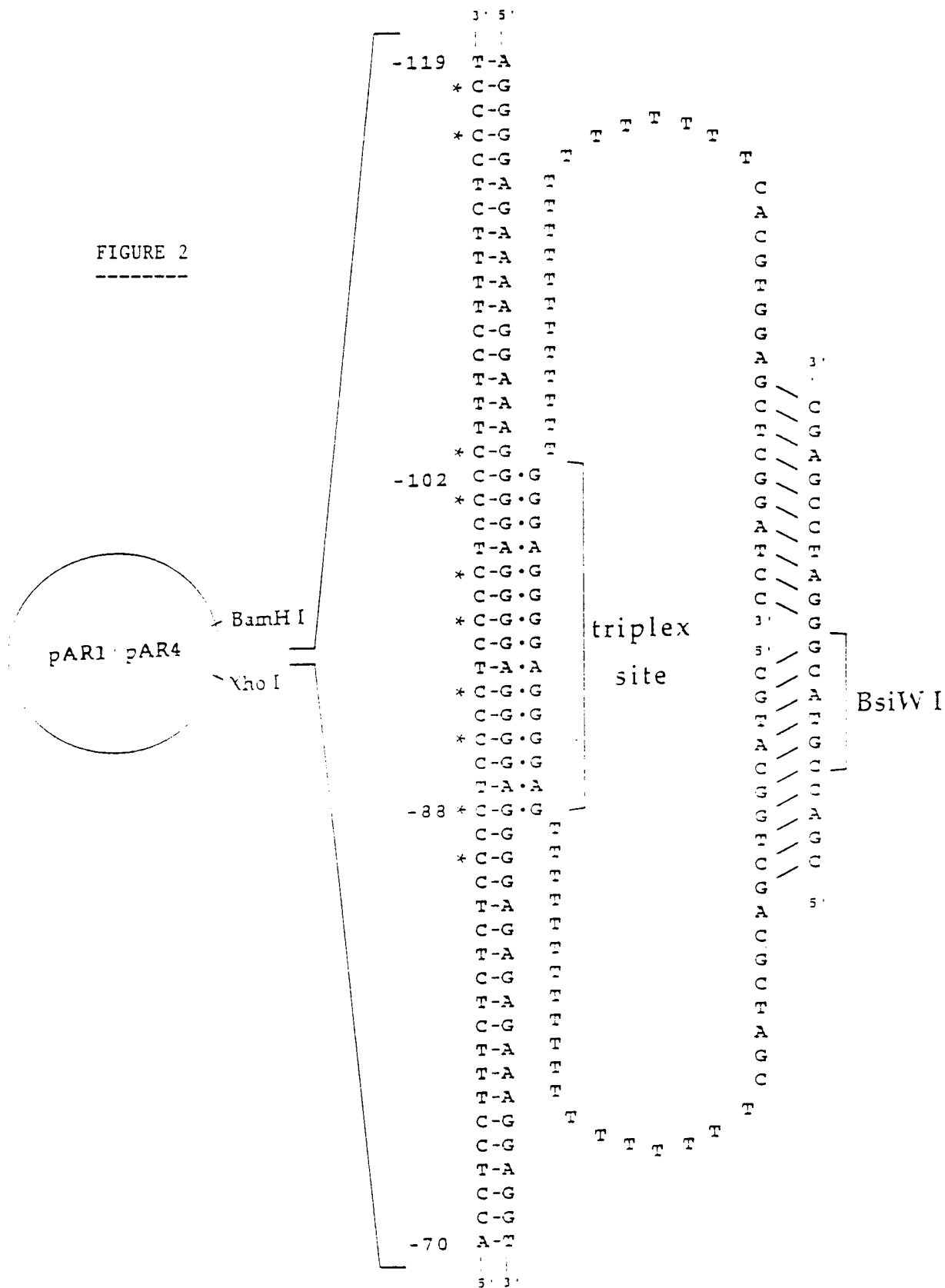
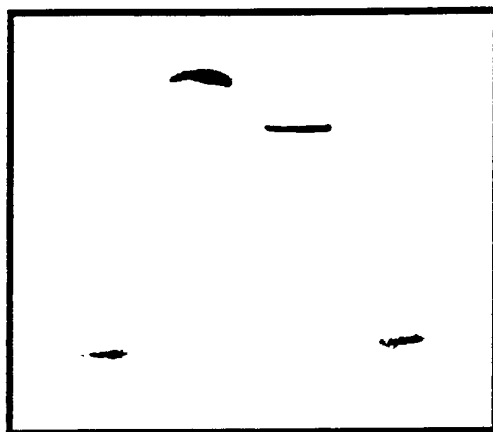


FIGURE 3

1 2 3 4



pAR1	-	+	+	-
pAR4	-	-	-	+
BamH I + Xho I	-	-	+	-

FIGURE 4

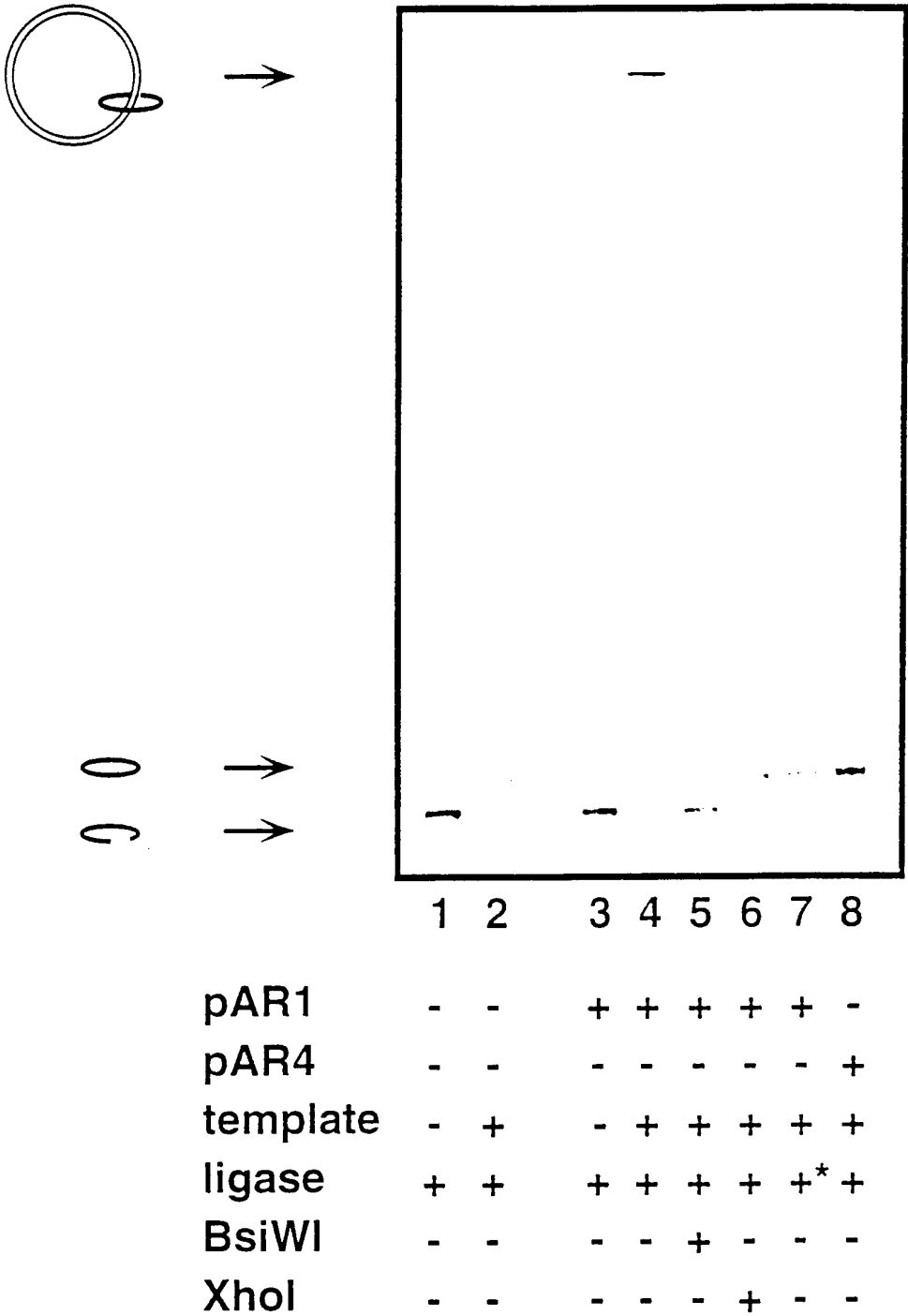
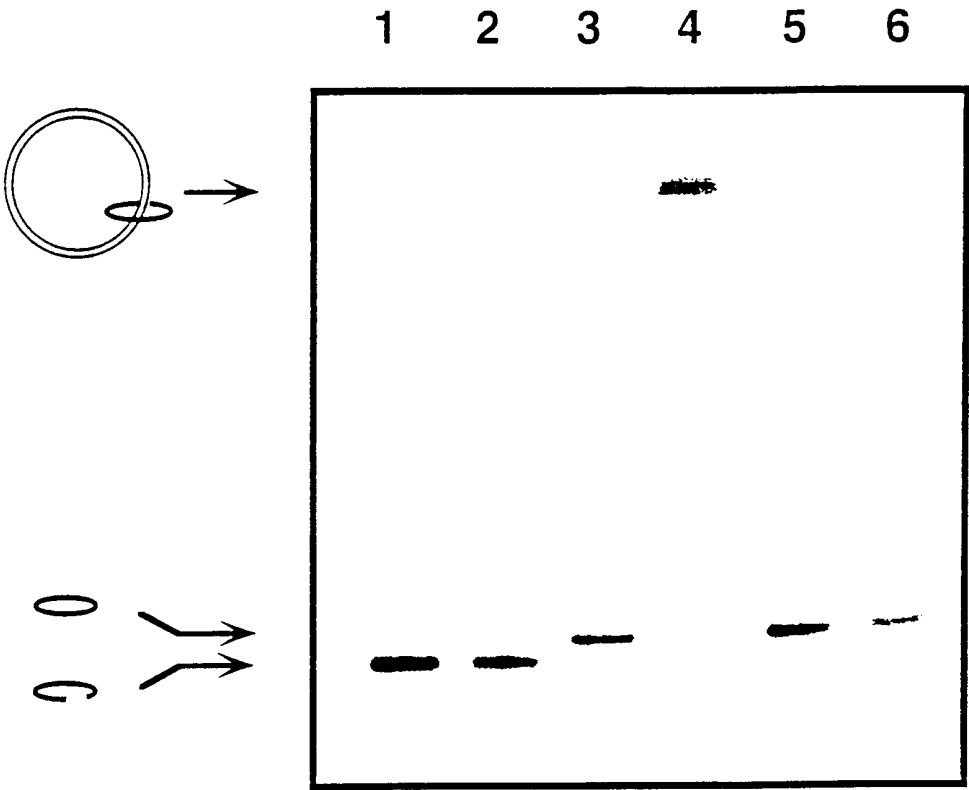


FIGURE 5



pAR1	-	+	-	+	+	+
template	-	-	+	+	+	+
ligase	+	+	+	+	+	+
XhoI	-	-	-	-	+	-

7/18

FIGURE 7

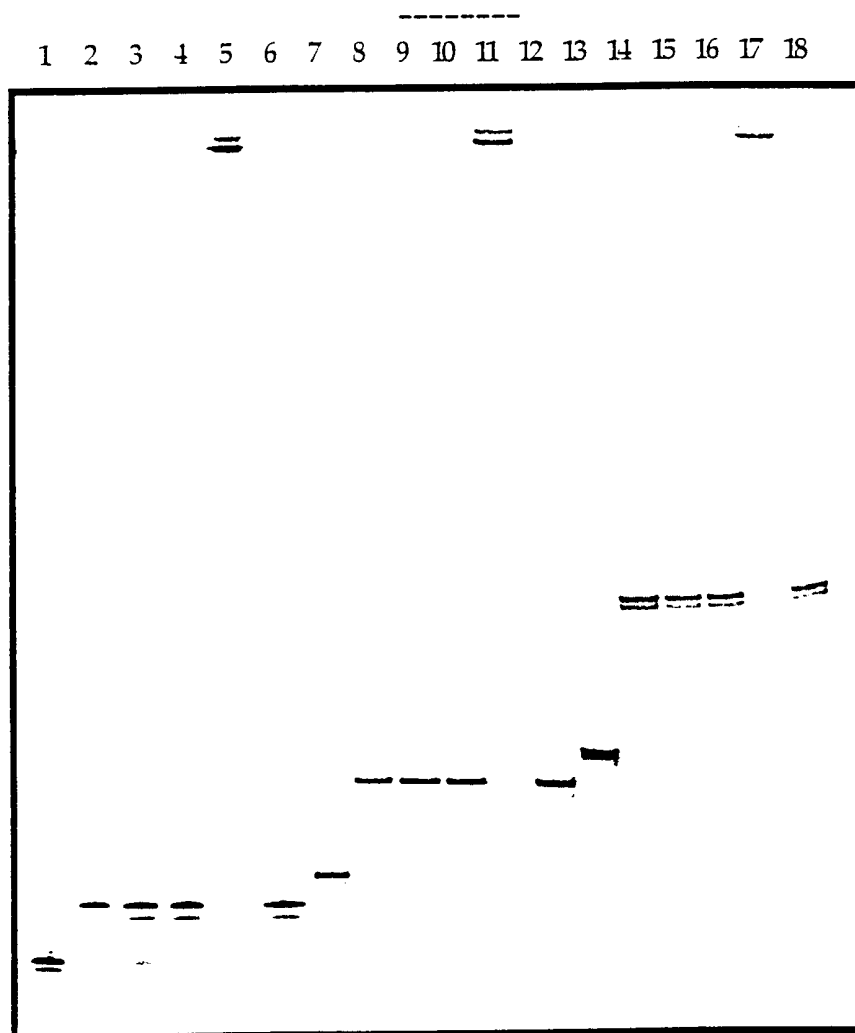
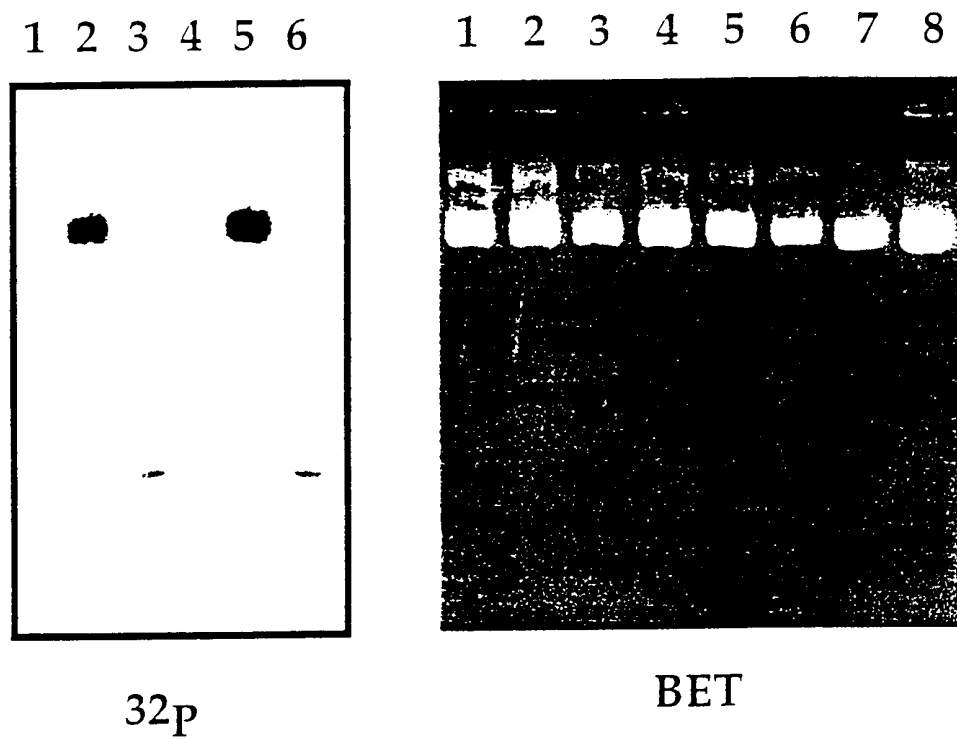


FIGURE 8



9/18

FIGURE 9

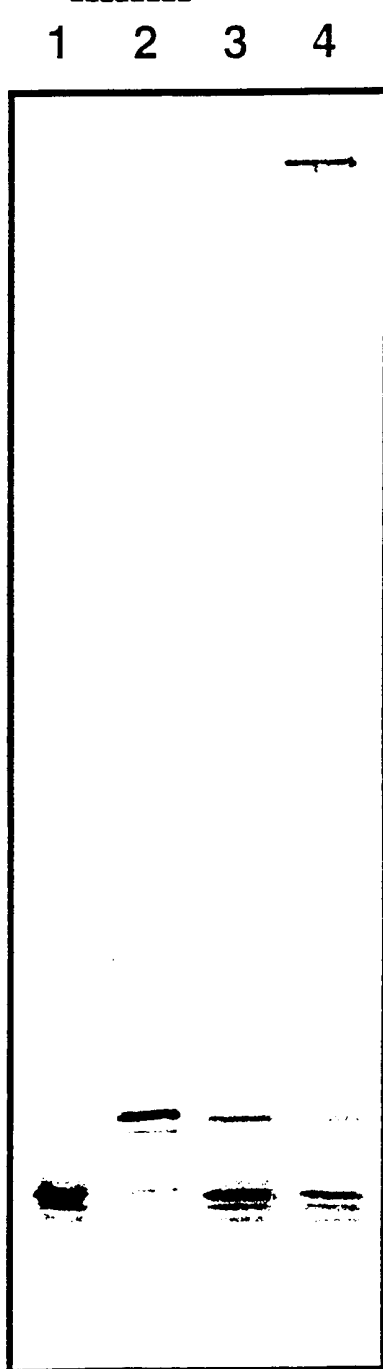


Figure 10

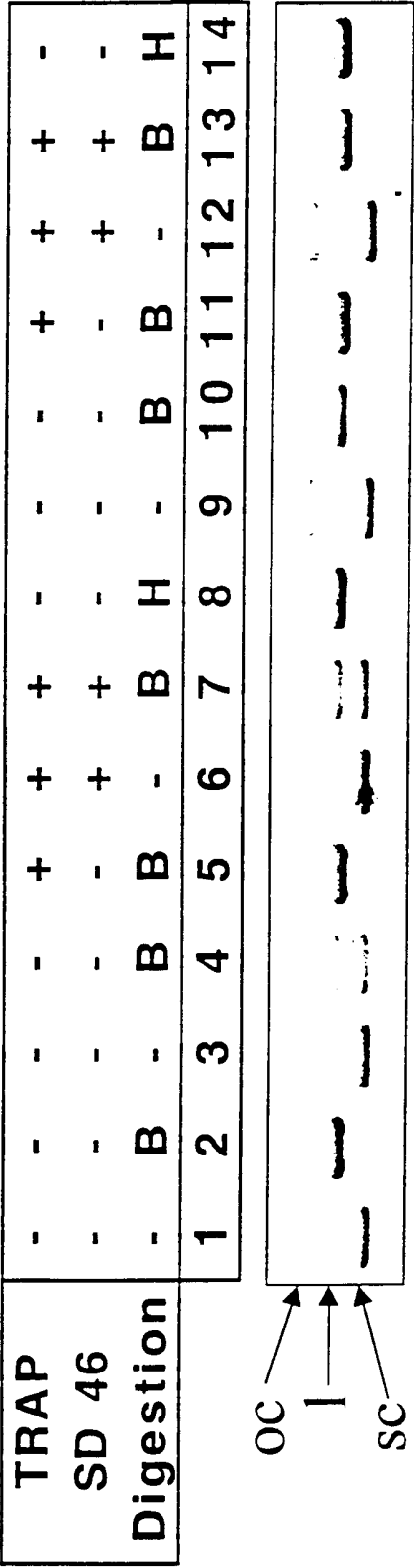
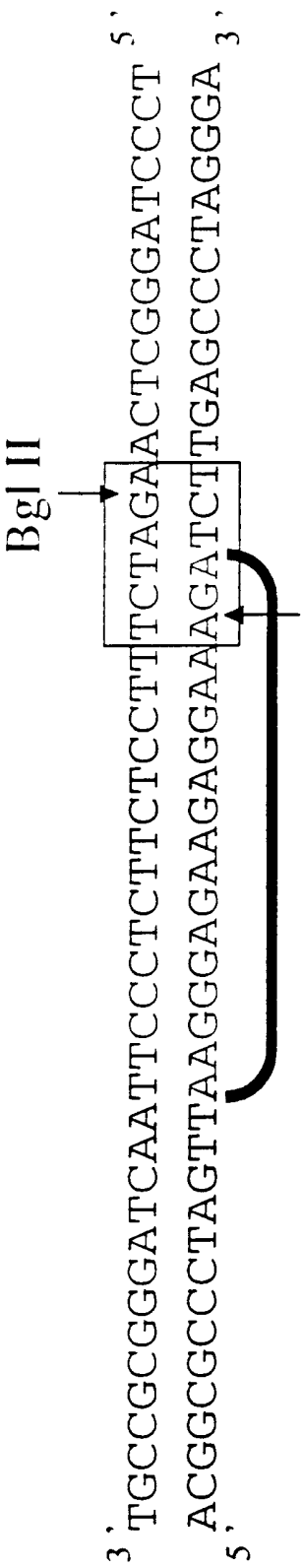


Figure 11

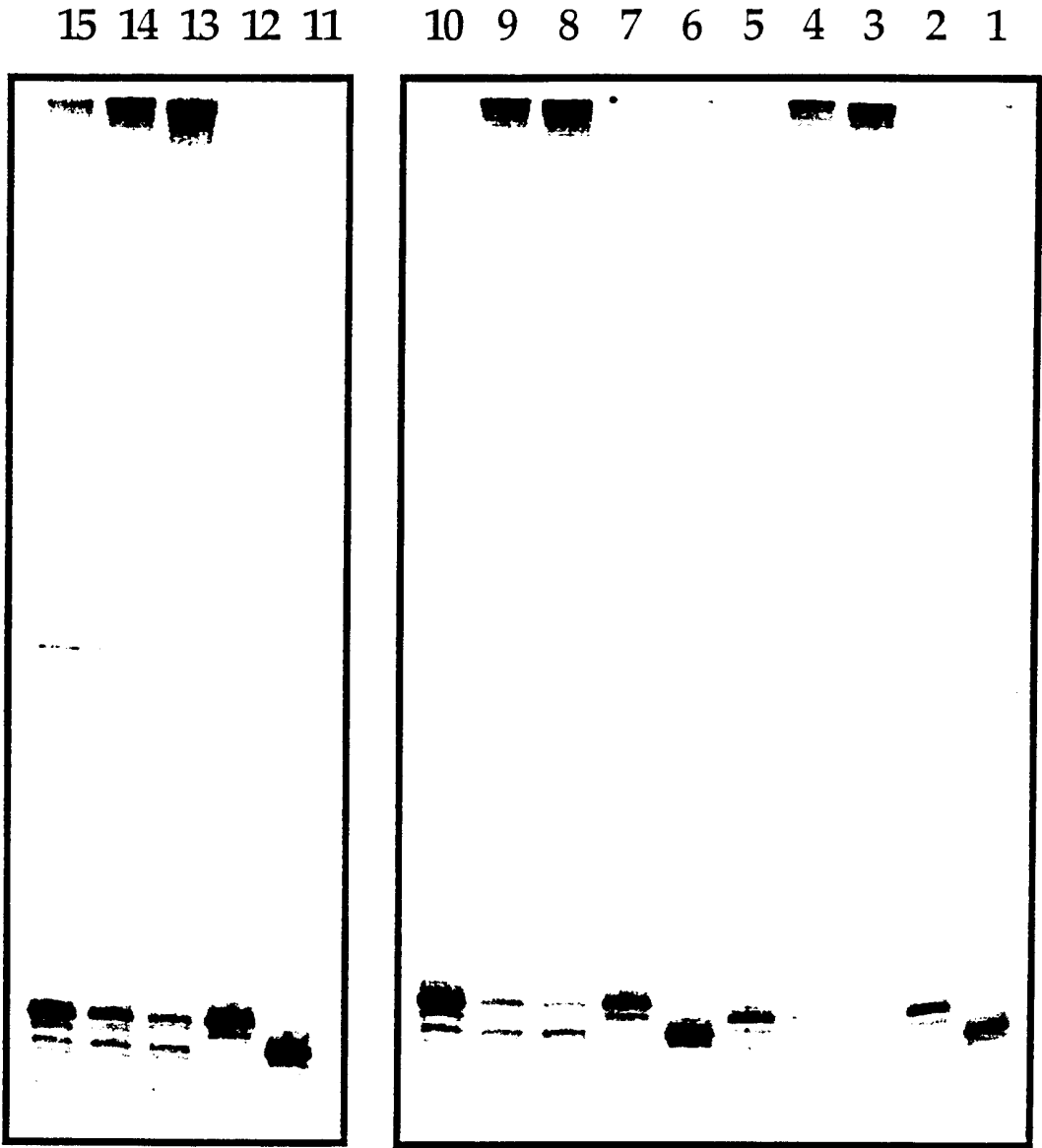


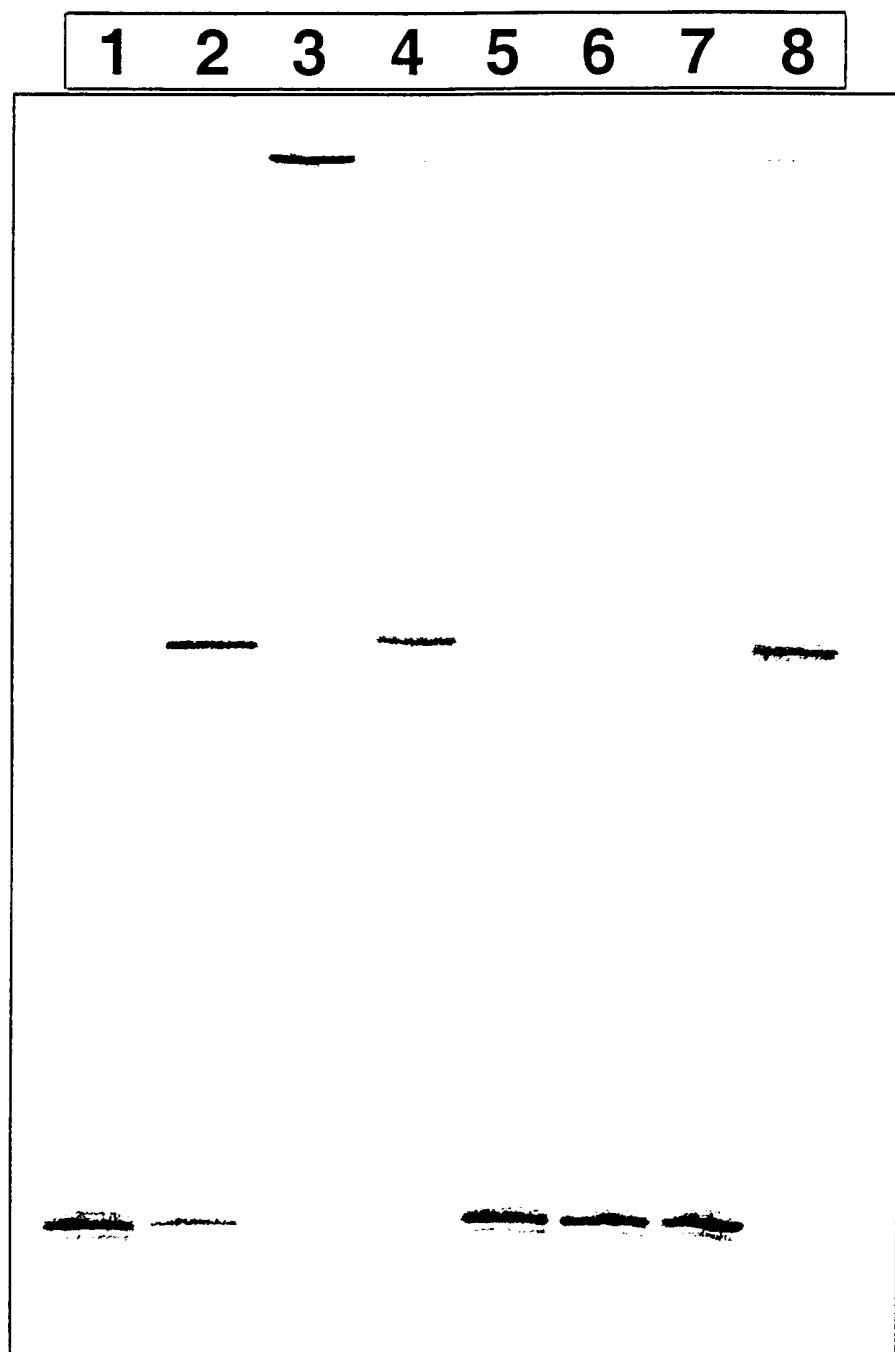
Figure 12

Figure 13

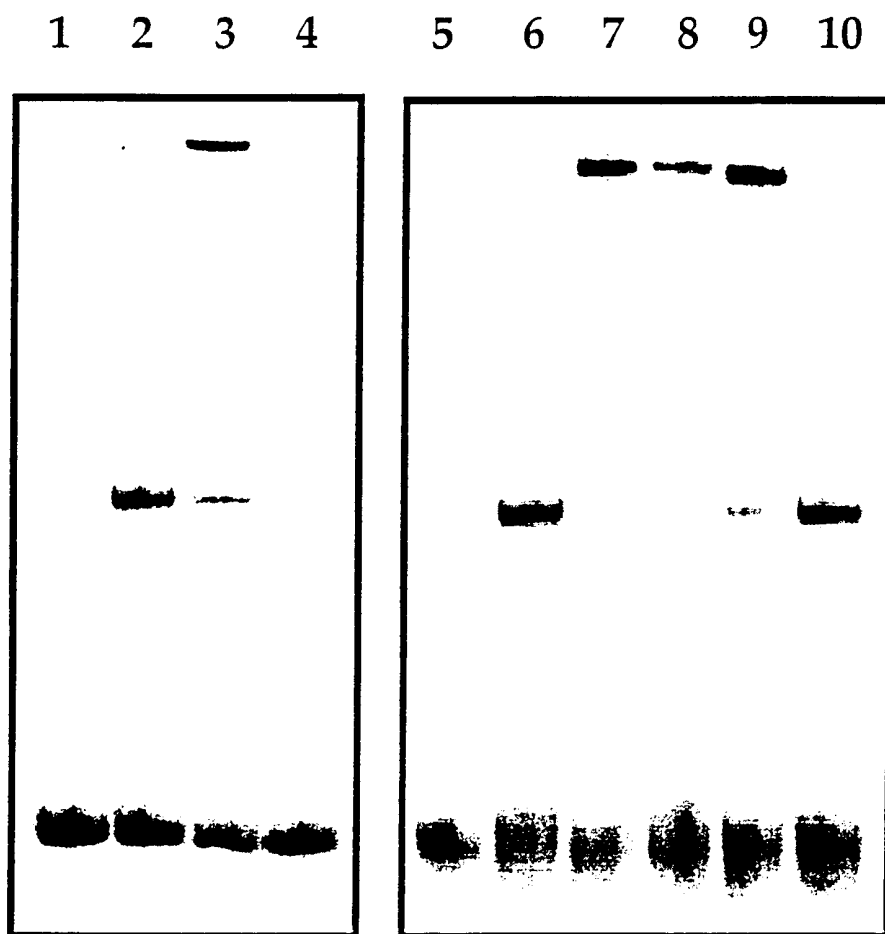


Figure 14

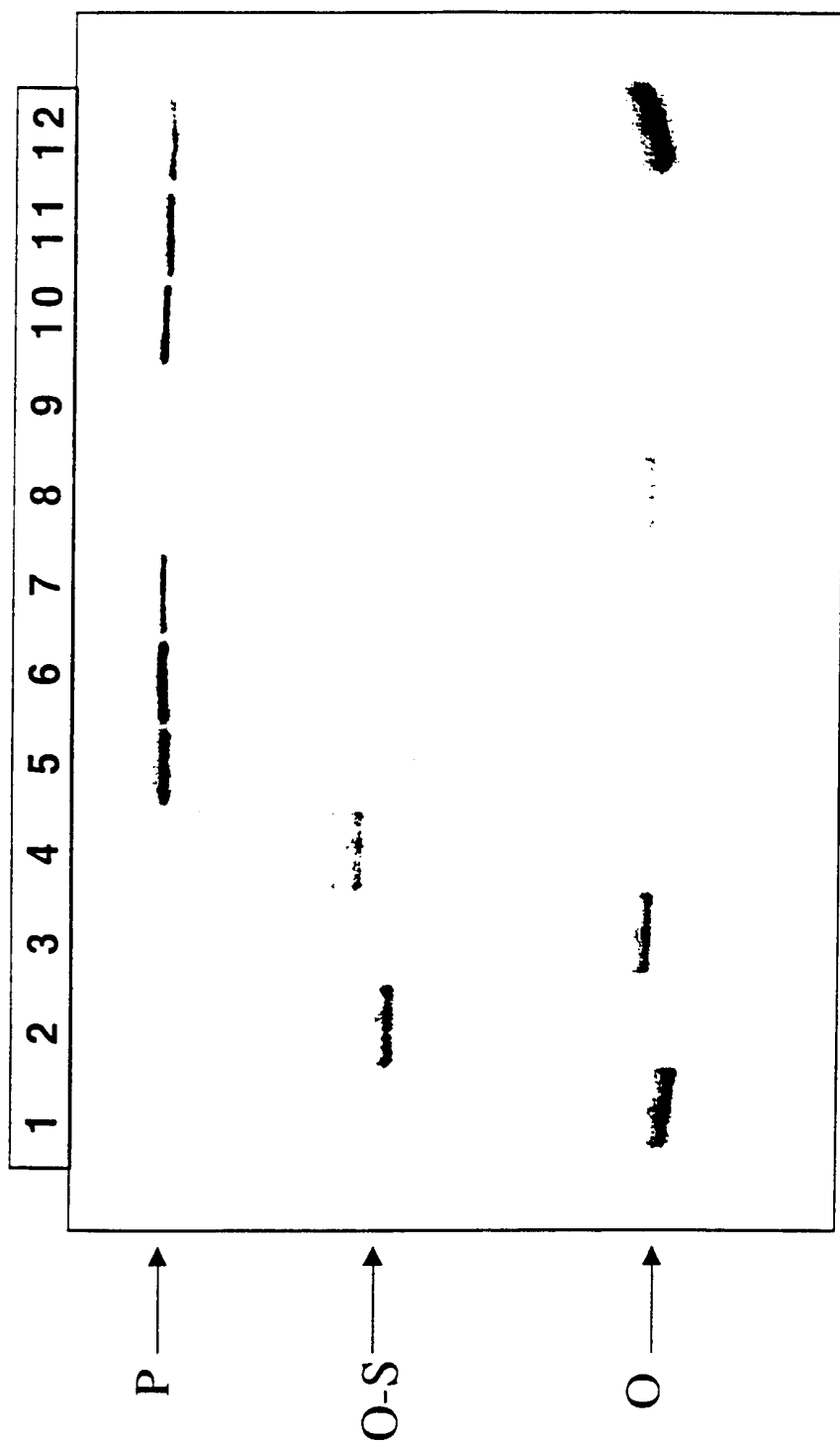


Figure 15

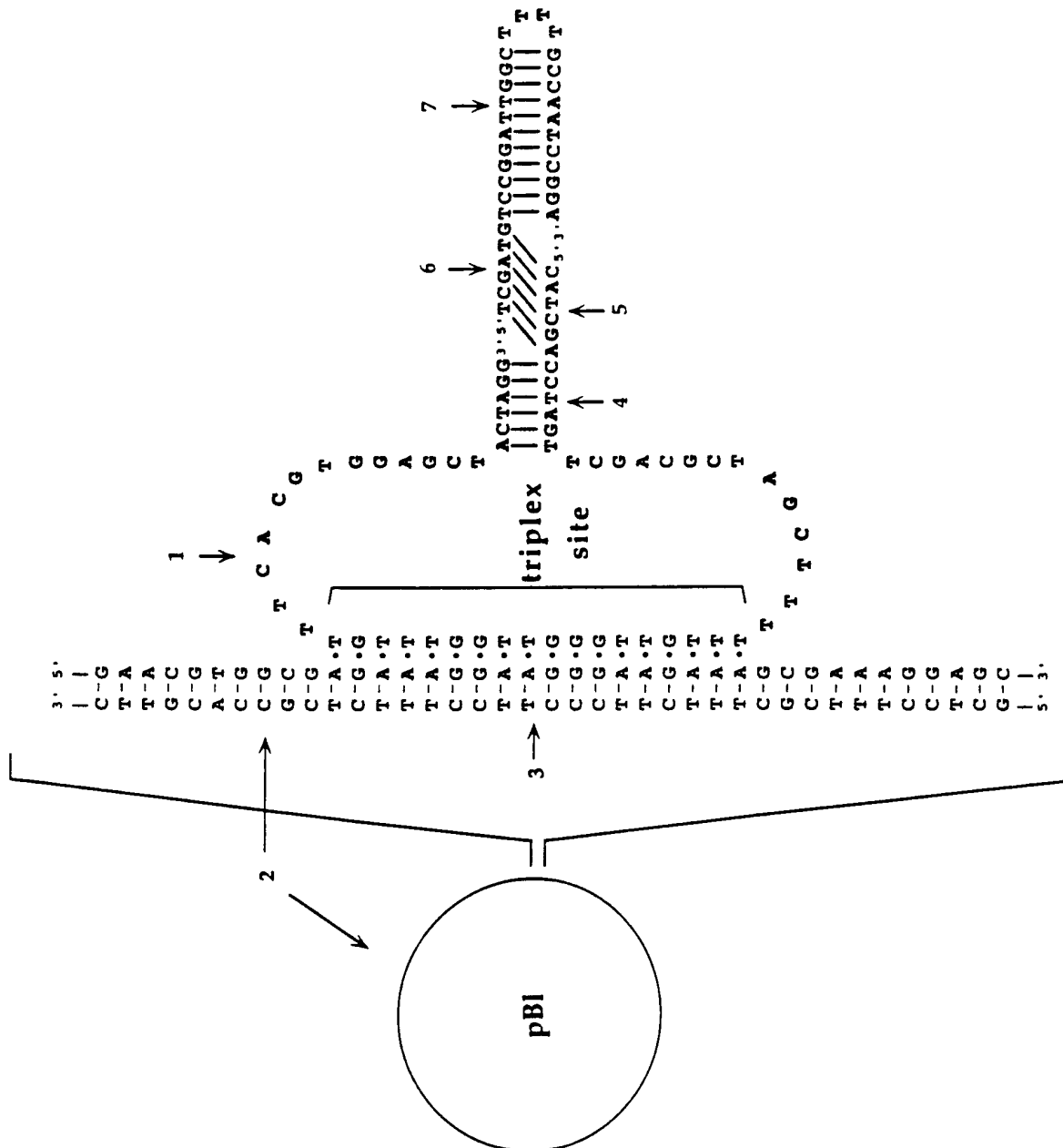


Figure 16

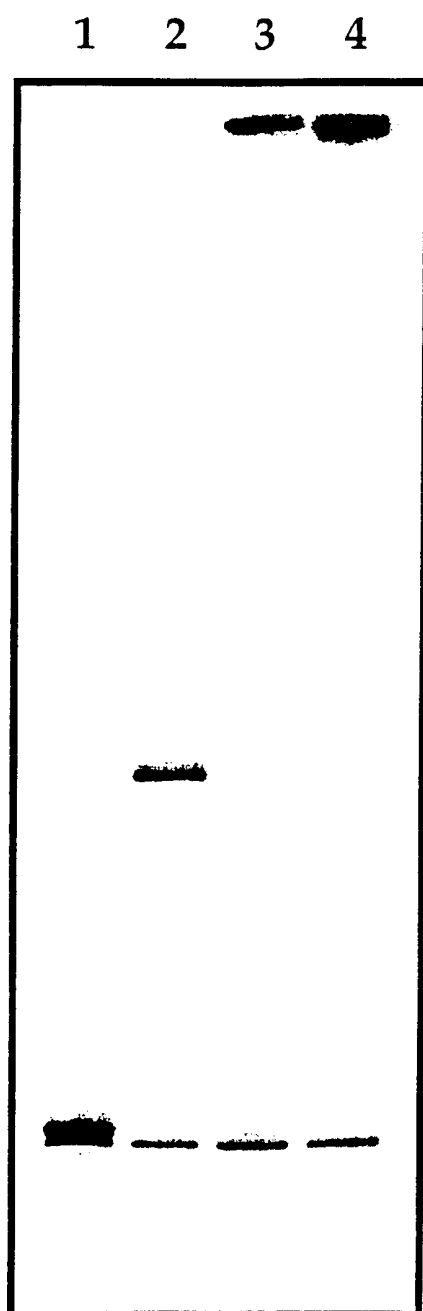


Figure 17

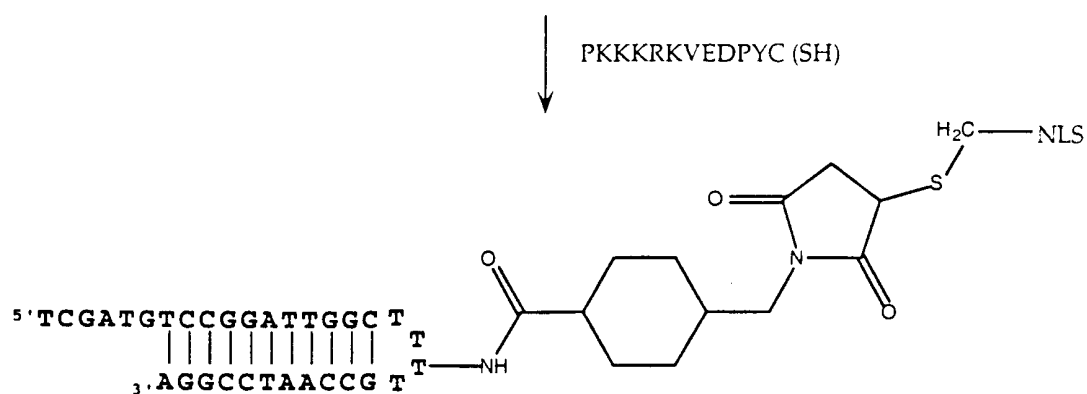
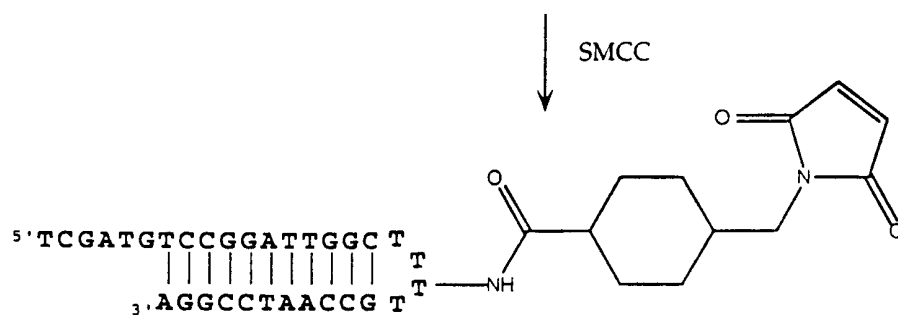
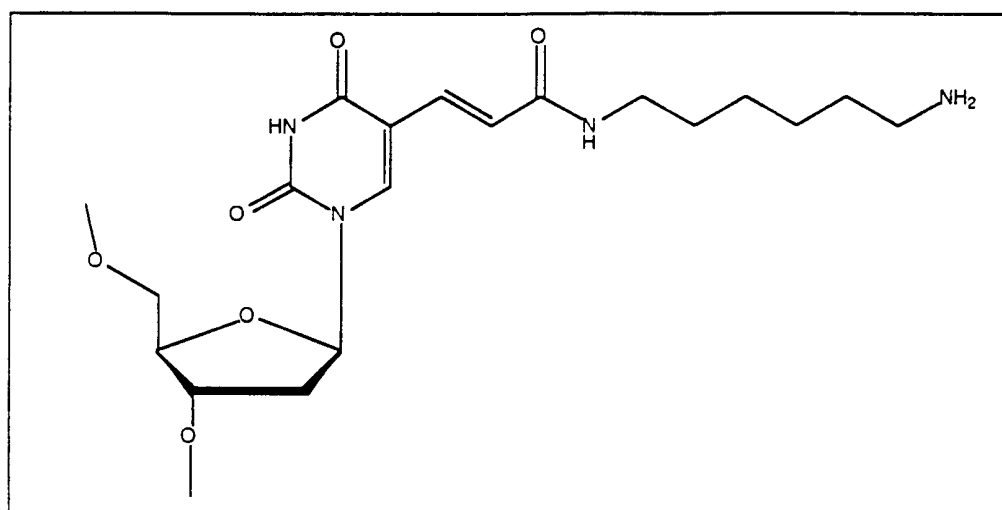
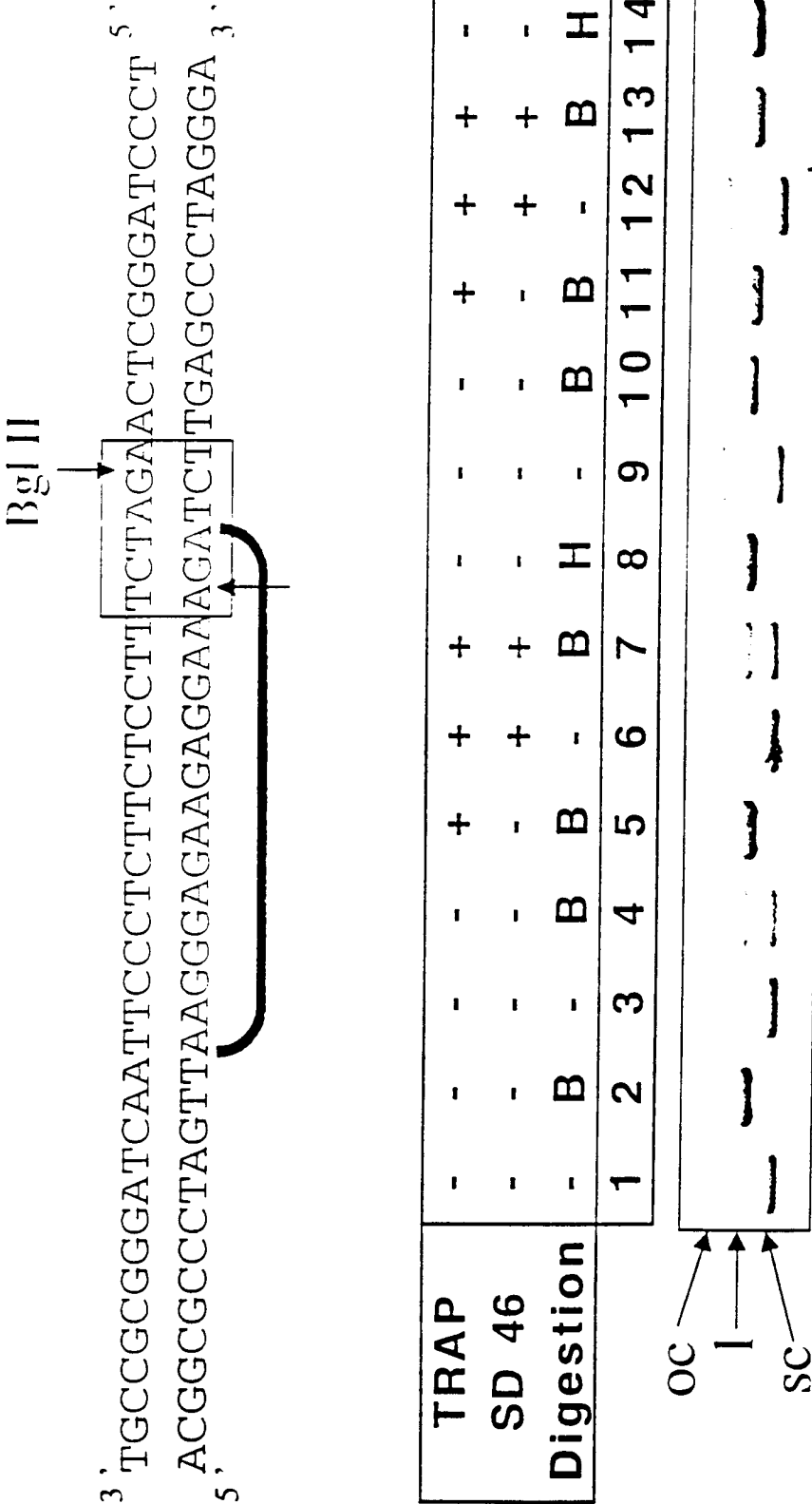


Figure 18



LISTE DE SEQUENCES

<110> I.N.S.E.R.M.
C.N.R.S.

<120> Procédé de circularisation d'oligonucléotides autour
d'un acide nucléique en double brin, les structures
obtenues et leurs applications.

<130> 59779-1154

<140>

<141>

<150> 9907503

<151> 1999-06-14

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 50

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 1

aggggagaaa aggaaagggg aggggagggg aggggagaga gaaaggaggt

50

<210> 2

<211> 50

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 2

acctcctttc tctctccctt cccctccctt cccctttcct tttctccctt

50

<210> 3

<211> 89

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 3

cgtacggtcg acgctagctt tttttttttt tttttttgag gggaggggag ggtttttttt 60
tttttttttt tcacgtggag ctcgatcc 89

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 4

gaggggaggg gaggg 15

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 5

cgaccgtacg ggatccgagc 20

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 6

gctagcgctcg accgtacggg atccgagctc cacgtg

36

<210> 7

<211> 14

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 7

ccgtacggga tccg

14

<210> 8

<211> 85

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 8

agcttcgtac ggcgcccag ttaagggaga agaggaaaga gattgagcga gccctagga 60
cgtcccgggc tagcgaattc ctgca 85

<210> 9

<211> 77

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 9

ggaattcgct agcccgggac gtccctaggg ctcgctcaat ctctttcctc ttctccctta 60
actcgggcgc cgtacag 77

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 10

aaggggagaag aggaaagaga

20

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 11

tgttttggtgt tgtggggt

18

<210> 12

<211> 86

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 12

cgtacgggtcg acgctagctt tttttttttt tttttttggt tggtggtgtg gggtttttttt 60
ttttttttca cgtggagctc ggatcc 86

<210> 13

<211> 69

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 13

cgtacgggtcg acgctagctt tttttttggt tggtggtgtg gggtttttttt tcacgtggag 60

ctcggatcc

69

<210> 14

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 14

cgtacgggtcg acgctagctt ttgtttggtg ttgtgggttt tcacgtggag ctcggatcc 59

<210> 15

<211> 49

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 15

cgtacgggtcg acgttttgtt tgggtgttggt ggttttggag ctcggatcc 49

<210> 16

<211> 43

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 16

cgtacgggtcg ttttgtttgg tggtgtgggt tttgctcgga tcc 43

<210> 17

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 17

ctcttctect ttctct

16

<210> 18

<211> 60

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 18

cgtacggtcg acgctagctt ttctcttctc ctttctcttt ttcacgtgga gctcggatcc 60

<210> 19

<211> 14

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 19

gtttgggtgt tgtg

14

<210> 20

<211> 12

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 20

gtgttggtggg tt

12

<210> 21

<211> 58

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 21

cgtacggtcg acgctagctt ttgtttgggt gttgtgtttt cacgtggagc tcggatcc 58

<210> 22

<211> 54

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 22

cgtacggtcg acgctagctt ttgtgttgtg ggttttcacg tggagctcgg atcc 54

<210> 23

<211> 43

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 23

cgtacggtcg ttttttgtgt tgtgggtttt ttgtctcgga tcc 43

<210> 24

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:"Modified_base"

<220>

<221> modified_base

<222> (11)..(12)

<223> mod_base = "hexaéthylèneglycol"

<220>

<221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> mod_base = "hexaéthylèneglycol"

<400> 24

cgtacggtcg tgtgttggtg gttgctcgga tcc

33

<210> 25

<211> 52

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 25

ctttccttct ctcctttttg gagagaagga aagtttttgt ttggttggtg gg

52

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 26

agaaaggaag ggaagaaa

18

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 27

tttcttccct tcctttct

18

<210> 28

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 28

tttggtgggt tggtttgt

18

<210> 29

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 29

cgtacggtcg acgetagctt tttggtgggt tggtttggtt tcacgtggag ctgggatcc 59

<210> 30

<211> 58

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:"modified_base"

<220>

<221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> mod_base="thymine-C6-biotine"

<400> 30

cgtacggtcg acgcagcttt ttggtgggtt ggtttgtttt cacgtggagc tcgggatcc 58

<210> 31

<211> 57

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:"Modified_base"

<220>

<221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> mod_base="thymine-C6-biotine"

<220>

<221> modified_base

<222> (44)..(45)

<223> mod_base="thymine-C6-biotine"

<400> 31

cgtacgggtcg acgcagcttt ttgttggtt gggttggttt cacgggagct cggatcc 57

<210> 32

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 32

tctttccttc ccttcttt 18

<210> 33

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 33

cgtacgggtcg acgctagctt ttctttcctt cccttctttt tcacgtggag ctcgatcc 59

<210> 34

<211> 68

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 34

cgtacggtcg acgttttgtt tgggtgtgtg ggttttcttt ccttccttc ttttgggagc 60
tcggatcc 68

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 35

agaagagga gagagagaga agg 23

<210> 36

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 36

ggttgtgtgt gtgtgggt 18

<210> 37

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 37

cgtacggtcg acgctagctt tggttgtgtg tgtgtgggtt tcacgtggag ctcgatcc 59

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 38

gaccgtacga tatcgcgagc 20

<210> 39

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 39

tcgtagcgtc gacgctagtt ttgtttggtg ttgtgggtt tcacgtggag ctcgcgata 59

<210> 40

<211> 59

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 40

tcgtagcgtc gacgctagtt ttctttcctt cccttctttt tcacgtggag ctcgcgata 59

<210> 41

<211> 63

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 41

catcgaccta gttcgacgct agctttttgt tgggttggtt tgttttcacg tggagctact 60
agg 63

<210> 42

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucléotide

<400> 42

togatgtccg gattggcttt tgccaatccg ga 32

<210> 43

<211> 63

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucleotide

<400> 43

catcgaccta gttcgacgct agctttttgtt tgggtgttggtt ggttttcacg tggagctact 60
agg 63

<210> 44

<211> 73

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucleotide

<220>

<223> Description de la molécule ADN/ARN

mixte:oligonucleotide

<220>

<223> Description de la molécule ADN/ARN mixte:ADN/ARN
mixte

<400> 44

catcgacctt gttcgacgct agcttttttt ttgtttggtg ttgtgggttt ttttttcacg 60
tggagctact agg 73

<210> 45

<211> 63

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucleotide

<400> 45

catcgacctt gttcgacgct agctttuguu ugguuggguu guuuttcacg tggagctact 60
agg 63