



(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN CORRIGE**

Avis: La bibliographie est mise à jour

(15) Information de correction:
Version corrigée no 1 (W1 B1)
Corrections, voir page(s) 4, 5

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/68**

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR1999/003059

(48) Corrigendum publié le:
06.10.2004 Bulletin 2004/41

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2000/034512 (15.06.2000 Gazette 2000/24)

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
18.02.2004 Bulletin 2004/08

(21) Numéro de dépôt: **99957373.6**

(22) Date de dépôt: **08.12.1999**

(54) **METHODE DE DIAGNOSTIC BASEE SUR LA FONCTION D'UNE PROTEINE PRODUITE DANS UN SYSTEME ACELLULAIRE A PARTIR D'UN ECHANTILLON D'ACIDES NUCLEIQUES**

DIAGNOSTISCHE METHODE BASIEREND AUF DER FUNCTION EINES PROTEINS DAS IN EINER ZELLFREIEN UMGEBUNG PRODUZIERT WIRD, AUSGEHEND VON EINER PROBE VON NUKLEINSÄUREN

DIAGNOSTIC METHOD BASED ON THE FUNCTION OF A PROTEIN PRODUCED IN A CELL-FREE ENVIRONMENT FROM A NUCLEIC ACID SAMPLE

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**

(74) Mandataire: **Breese, Pierre**
Breese - Majerowicz - Simonnot
3, avenue de l'Opéra
75001 Paris (FR)

(30) Priorité: **08.12.1998 FR 9815487**

(56) Documents cités:
EP-A- 0 518 557 **WO-A-92/07949**
WO-A-94/05812 **WO-A-94/24303**
WO-A-95/09925 **WO-A-96/08580**
GB-A- 2 276 621 **US-A- 4 557 862**
US-A- 5 760 207

(43) Date de publication de la demande:
04.10.2001 Bulletin 2001/40

(60) Demande divisionnaire:
04290402.9 / 1 431 401

(73) Titulaire: **Proteus S.A.**
30000 Nîmes (FR)

- **RESTO ET AL.: "AMPLIFICATION OF PROTEIN EXPRESSION IN A CELL FREE SYSTEM" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 22, 1992, pages 5979-5983, XP002119012**
- **HENKEL T ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF MUTATED CDNA CLONES BY DIRECT USE OF PCR PRODUCTS IN IN VITRO TRANSCRIPTION/TRANSLATION REACTIONS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,US,ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 214, no. 1, 1 octobre 1993 (1993-10-01), pages 351-352, XP000396228 ISSN: 0003-2697**

(72) Inventeurs:
• **BLOCH, Jean-François**
F-30000 Nîmes (FR)
• **DUPRET, Daniel**
F-30420 Calvisson (FR)
• **MASSON, Jean-Michel**
F-31400 Toulouse (FR)
• **LEFEVRE, Fabrice**
30900 Nîmes (FR)
• **DAUTEL, Sandrine**
F-33000 Nîmes (FR)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

- HOELTKE ET AL.: "BIOTIN IN VITRO TRANSLATION, NONRADIOACTIVE DETECTION OF CELL-FREE SYNTHESIZED PROTEINS" BIOTECHNIQUES, vol. 18, no. 5, 1995, pages 900-907, XP002118684
- OHUCHI ET AL.: "IN VITRO METHOD FOR THE GENERATION OF PROTEIN LIBRARIES USING PCR AMPLIFICATION OF A SINGLE DNA MOLECULE AND COUPLED TRANSCRIPTION/TRANSLATION" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 19, 1998, pages 4339-4346, XP002119037
- DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-287962 XP002118685
KAENNO : "AN HCV PROTEINASE ACTIVE SUBSTANCE-WHICH HAS ACTIVITY AS AN ANTI-HCV AGENT AND CAN BE USED TO SCREEN FOR PROTEINASE INHIBITORS" & JP 07 184648 A (SUMITOMO METAL IND LTD), 1995
- JERMUTUS ET AL: 'Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation' CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY vol. 9, 1998, pages 534 - 548

Description

5 [0001] La présente invention a pour objet une méthode de détection et/ou de quantification d'une fonction connue à partir d'un échantillon d'acides nucléiques. La méthode de l'invention trouve notamment son application dans l'analyse *in vitro* d'une fonction connue à partir d'un échantillon d'acides nucléiques. Cette méthode trouve aussi son application dans le domaine du diagnostic, où la fonction recherchée est caractérisée par exemple par la présence d'une activité enzymatique, de cellules cancéreuses, d'organismes pathogènes (bactériens ou viraux), d'une mutation spécifique, d'un gène étranger.

10 [0002] Aujourd'hui, la recherche de séquences polynucléotidiques cibles représente un objectif majeur dans de nombreux laboratoires de recherche impliqués dans de nombreux domaines d'activité, et principalement dans le domaine médical ou agroalimentaire ou l'industrie chimique. Dans ces domaines, la recherche de séquences cibles visent par exemple :

- Le diagnostic de virus à l'origine de maladies, telles que le Sida (HIV) ou l'hépatite B (HBV).
- 15 - Le diagnostic spécifique de maladies d'origine bactérienne, telle que la tuberculose ou la lèpre.
- Le diagnostic de mutations à l'origine de maladies génétiques ou de cancers cellulaires.
- Le diagnostic d'une contamination bactérienne dans une chaîne agroalimentaire.
- La recherche des microorganismes impliqués dans la corrosion biologique des canalisations ou des containers utilisés dans des procédés industriels.

20 [0003] La difficulté majeure des méthodes de diagnostic utilisées dans l'art antérieur réside dans la spécificité, la sensibilité, la rapidité et la reproductibilité du test de diagnostic utilisé. Il est indispensable de pouvoir donner un résultat certain. Il convient donc de disposer d'une méthode pouvant être réalisée à partir d'un échantillon de départ de quelque nature ou origine qu'il soit. Il faut en outre une méthode permettant de réduire les faux positifs dus à la composition de l'échantillon ou générés par la méthode mise en oeuvre.

25 [0004] Or, comme indiquées précédemment, les méthodes de l'art antérieur sont essentiellement basées sur la détection de fragments d'acides nucléiques permettant éventuellement de quantifier un gène. Parmi celles-ci, on peut citer :

- 30 - Les tests utilisant des sondes génétiques, où la quantité de séquence cible détectée dépend de la taille et de l'homologie de la sonde. Ces tests sont appliqués à la détection de différents organismes, comme des bactéries, des virus, des mycobactéries, des champignons ou d'autres parasites. Le problème de ces tests réside dans leur faible sensibilité.
- Les tests d'amplification type PCR ou autres qui permettent de détecter spécifiquement une information génétique avec une réelle sensibilité, qui doit être tout de même nuancée par des problèmes techniques conduisant à des faux positifs.

35 [0005] Lors d'un diagnostic de séquences par amplification PCR, on n'est pas sûr de la nature de l'amplicon, et dans le cas où la protéine analysée est recherchée par immunodétection, les résultats peuvent correspondre à une réaction croisée non spécifique. De plus dans ces deux cas, on ne connaît pas l'activité de la protéine recherchée.

40 [0006] De plus, ces tests de détection ne permettent pas d'obtenir des informations sur l'activité fonctionnelle du produit du gène, ce qui peut :

- engendrer des faux positifs lors de la détection de séquences homologues à la place de la séquence cible,
- 45 - engendrer des erreurs de diagnostique, comme dans le cas de la détection d'un gène muté qui code pour une protéine non fonctionnelle,
- aboutir à un niveau d'information insuffisant, comme par exemple la détection d'un pathogène sans pour autant donner d'indication sur sa virulence ou sa sensibilité à un traitement, ce qui conduit à un défaut de caractérisation,
- aboutir à un seuil de sensibilité trop faible.

50 [0007] On peut aussi citer les tests immunologiques ou d'incorporation de radioactivité lors de synthèse de protéines qui permettent de détecter et éventuellement de quantifier directement une protéine. Des anticorps sont en effet utilisés en routine pour identifier spécifiquement un antigène dans un échantillon. Cependant, ces tests ne donnent généralement pas d'information sur l'activité fonctionnelle de la protéine.

55 [0008] Il existe également dans l'art antérieur, des tests permettant d'effectuer directement la détection d'une fonction à partir d'un échantillon sans passer par les acides nucléiques présents dans ledit échantillon. Il s'agit alors de travailler directement sur l'ensemble des facteurs présents dans l'échantillon et susceptibles d'agir sur le test fonctionnel. Cependant, il ne sera pas possible de distinguer une même fonction provenant de deux facteurs différents. Il peut s'agir

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

par exemple d'une fonction associée à deux virus différents qu'il ne sera pas possible de distinguer avec le même test fonctionnel. On peut citer, la détection de l'activité fonctionnelle reverse transcriptase proposée dans la demande de brevet PCT publiée sous le No. WO96/23076, dont on ne peut pas déterminer si l'activité reverse transcriptase provient d'HIV ou d'un autre virus.

5 **[0009]** On peut enfin citer les tests de détection de fonction et de variants fonctionnels basés sur des étapes réalisées *in vivo* comme les antibiogrammes, ou des techniques d'essais phénotypiques par exemple sur le virus HIV. Si les souches manipulées sont dangereuses, elles nécessitent des conditions de sécurité particulières donc des aménagements spéciaux des laboratoires. Outre leur complexité de mise en oeuvre qui les rend difficilement automatisable, ces tests sont onéreux et de mise en oeuvre longue et fastidieuse. Ainsi, dans le cas des virus, l'isolement des virus dure de 4 à 10 semaines. Des tests plus récents fondés sur des méthodes de clonage d'une activité enzymatique prennent encore de 3 à 4 semaines. De plus, ces tests ne permettent pas toujours de détecter les variants minoritaires.

10 **[0010]** On a décrit dans l'art antérieur les travaux suivants :

15 Resto et al. (1992, NAR 20 (22), 5979-5983) concernant une méthode d'amélioration de l'expression de protéines dans un milieu acellulaire.

Henkel et Baeuerle (1993, Analytical Biochemistry 214 (1), 351-352), concernant une méthode de comparaison de mutants par l'expression directe *in vitro* de produits de PCR.

20 Hoeltke et al., (1995, Biotechniques 18 (5), 900-907), décrivant une méthode de marquage de protéines exprimées *in vitro* qui constitue une alternative au marquage radioactif.

La demande de brevet WO9424303, concernant une amélioration de la méthode de synthèse *in vitro* de protéines. La demande de brevet WO927949, concernant une méthode de production de protéines *in vitro* sans passer par une étape de clonage.

25 Database WPI, AN 1995-287962, décrivant la séquence d'une protéinase d'HCV et son utilisation dans un test d'activité.

La demande de brevet GB2276621, décrivant un vecteur utilisé dans des essais de productions *in vivo* de la protéase d'HIV utilisés pour identifier des inhibiteurs de l'enzyme.

La demande de brevet WO9608580, décrivant une méthode *in vitro* pour évaluer l'efficacité d'une drogue contre une forme mutante biologiquement active ou contre une forme sauvage de la protéinase HIV.

30 Jermutus et al. (1998, Current Opinion in Biotechnology 9 534-548), décrivant les avancées récentes dans la production et la sélection de protéines produites dans un milieu acellulaire.

35 **[0011]** Le but de la présente invention est précisément d'offrir une méthode de détection et avantageusement de quantification d'une fonction connue éventuellement présente dans un échantillon ne présentant pas les inconvénients ci-dessus. La méthode de l'invention s'applique, bien entendu, à la détection et/ou la quantification simultanée ou non d'une ou plusieurs fonctions connues présentes dans le même échantillon ou dans des échantillons différents regroupés. Ainsi, l'emploi par la suite du terme "fonction" au singulier couvrira également le terme "fonctions" au pluriel et vice versa, sauf lorsqu'il sera indiqué explicitement qu'il s'agit de la mise en oeuvre de la méthode de l'invention sur plusieurs fonctions. La méthode de l'invention permet donc non seulement de détecter et avantageusement de quantifier une ou plusieurs fonctions, mais aussi de les caractériser d'un point de vue biochimique à partir d'un seul échantillon.

40 **[0012]** Le but de la présente invention est maintenant d'offrir une méthode de diagnostic basée sur la fonction d'une ou plusieurs protéines produites dans un système acellulaire à partir des acides nucléiques d'un échantillon.

45 **[0013]** On entend par fonction, l'activité d'une ou plusieurs protéines spécifiques d'au moins un organisme ou d'au moins un processus, et que l'on détecte et/ou quantifie selon la présente invention par le biais d'un test de la fonction de la ou desdites protéines. Dans le cadre de cette invention, le phénotype est considéré comme une fonction. La méthode de l'invention trouve donc tout particulièrement son application dans le domaine du diagnostic *in vitro* et notamment en matière d'analyse d'une fonction. En effet, on entend aussi par fonction, au sens de la présente invention, la manifestation d'une propriété observable correspondant à l'expression d'un ou plusieurs gènes. Cette manifestation peut se traduire par l'expression d'un trait morphologique, d'un syndrome clinique, d'une résistance à un composé toxique, de l'activité d'une protéine ou encore de la production d'une substance comme un métabolite, un antibiotique, etc... Dans le cadre de cette définition de la fonction, l'invention permet aussi l'analyse *in vitro* d'une fonction correspondant au résultat de l'expression de plusieurs gènes, les protéines correspondantes étant toutes nécessaires à l'expression de ladite fonction. Dans cette forme de réalisation de l'invention, les gènes codant pour cette ou ces fonctions peuvent être situés :

- 55
- sur le même fragment d'ADN, dans le cas d'un phénotype exprimé par un opéron,
 - à différents endroits de l'ADN génomique, dans le cas de certaines voies métaboliques.

5 [0014] Le phénotype analysé selon le procédé de l'invention peut donc ne pas être seulement celui associé à une protéine, mais celui associé à un ensemble de protéines. Il s'agit par exemple, comme indiqué précédemment, d'un phénotype correspondant à la synthèse d'un métabolite (métabolite énergétique, antibiotique, etc...), à la dégradation d'un composé (de type nutriment ou xénobiotique) ou à l'assemblage d'une protéine complexe constituée de plusieurs sous-unités identiques ou différentes.

10 [0015] La fonction peut correspondre par exemple à une activité enzymatique ou une affinité. Dans le cadre de la mise en évidence d'une activité enzymatique, tout type de substrat spécifique peut être envisagé par l'homme de métier pour mettre en évidence la présence de la fonction recherchée. L'homme de métier pourra par exemple se référer à des ouvrages comme *Methods In Enzymology* ou *Annual Review Of Biochemistry*, dans lesquelles un grand nombre de méthodes de dosage d'enzymes et de préparation de substrats ont été décrites. Dans le cas de la mise en évidence d'une affinité par exemple d'un antigène pour un anticorps, d'une protéine pour de l'ADN, d'un récepteur pour un ligand etc... la mise en évidence d'une fonction peut être réalisée par exemple par des tests tels que la fixation de ligands marqués par un isotope ou par une enzyme ou par un fluorophore, par une détection immunologique utilisant des anticorps marqués par un métal ou par une enzyme ou par un fluorophore.

15 [0016] On entend par organisme, tout type d'organisme ou micro-organisme, comme des virus, des bactéries, des algues, des champignons, ou tout produit comportant des acides nucléiques synthétiques ou naturel permettant l'expression des fonctions recherchées par le procédé de l'invention.

[0017] On entend par processus, le développement d'une maladie, d'une infection ou de cellules par exemple cancéreuses ou de contaminants. Ces processus peuvent avoir lieu sur un hôte ou dans un procédé industriel.

20 [0018] On entend par extrait de traduction un extrait comportant tous les facteurs nécessaires à l'étape de traduction à partir des messagers néosynthétisés comme par exemple des ribosomes, des tRNA, des facteurs d'élongation, des facteurs d'initiation etc... .

[0019] On entend par fonction connue, la fonction qui est analysée selon le procédé de l'invention et qui peut être détectée et/ou mesurée par un test fonctionnel.

25 [0020] Le matériel biologique à partir duquel est obtenu l'échantillon sur lequel est réalisée la méthode de l'invention peut être tout échantillon susceptible de contenir des acides nucléiques de type humain, animal, végétal, microbien, viral ou des échantillons provenant du sol, de l'eau, de biopsie, de cellules diverses, un processus ou un organisme. Ces échantillons peuvent aussi correspondre à des produits de toute méthode d'amplification de l'ADN génomique, de l'ADN synthétique, de l'ARN, ou tout produit d'acides nucléiques issus de traitements couramment utilisés par l'homme de métier. Il peut s'agir, bien entendu, d'un échantillon biologique brut comme du sang, des tissus, de l'urine ou tout autre liquide corporel comme le liquide cébrospinal, synovial, pleural, péricardial ou préalablement traité pour préparer les acides nucléiques qu'il contient.

30 [0021] La présente invention a donc pour objet une méthode de diagnostic de la présence d'un organisme ou du développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules, dans un échantillon biologique, caractérisée en ce que l'on détecte et/ou mesure la fonction d'une ou plusieurs protéines spécifiques dudit organisme ou développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules, lesdites protéines étant produites dans un système acellulaire à partir des acides nucléiques de l'échantillon.

35 [0022] Plus particulièrement, la méthode ci-dessus comprend les étapes suivantes :

40 a) la préparation, à partir des acides nucléiques de l'échantillon, de molécules d'acides nucléiques comprenant le ou les gènes codant pour une ou plusieurs protéines spécifiques dudit organisme ou développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules, et les éléments de contrôle nécessaires à la transcription et à la traduction du ou desdits gènes;

45 b) la transcription et la traduction dans un système acellulaire des molécules d'acide nucléique préparée(s) à l'étape (a);

c) le diagnostic de la présence d'un organisme ou du développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules par détection et/ou mesure de la fonction de la ou des protéines produites à l'étape (b).

50 [0023] L'exposé des différentes formes de mise en oeuvre de l'invention est conformes aux revendications. Il faut ainsi entendre par méthode de détection et/ou de quantification, une méthode de diagnostic.

[0024] Lorsque le procédé de l'invention est une méthode de détection, on prépare à l'étape (a) au moins une molécule d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction. Tout préférentiellement, lorsque la méthode de l'invention est une méthode de quantification, on prépare à l'étape (a), une quantité de molécules d'acides nucléiques proportionnelle à la quantité du ou desdits gènes éventuellement présent(s) dans les acides nucléiques de l'échantillon. En conséquence, les procédés mis en oeuvre à l'étape (a) comme décrit ci-après, sont mis en oeuvre de façon à assurer cette proportionnalité.

55 [0025] Afin de faciliter l'exposé de l'invention, on désigne à l'étape (a) de la méthode de l'invention, sous le terme de gène, toute séquence d'acides nucléiques permettant l'expression de la ou des protéine(s) correspondant à la

fonction détectée. Il peut donc s'agir de séquence d'ADN ou d'ARN.

[0026] La détection et/ou la mesure de la fonction correspondant à la ou aux protéines produites à l'étape (b) est réalisée par tout test fonctionnel de la ou desdites protéines déterminé de l'homme du métier. Si les acides nucléiques sont présents dans l'échantillon, la fonction est détectée ou dosée de manière directe ou indirecte par un ou plusieurs tests fonctionnels de la ou des protéines produites à l'étape (b). La détection et/ou la mesure de la fonction correspondant à la ou aux protéines produites à l'étapes (b) peut mettre en oeuvre à l'une des étapes (a) et/ou (b) et/ou (c) une ou plusieurs molécules rapporteur permettant de révéler la présence de la ou des fonctions analysées caractéristiques d'un processus ou d'un organisme.

[0027] La molécule rapporteur, si elle est présente, peut être toute substance capable de révéler directement ou indirectement la fonction connue recherchée codée par la ou les protéines exprimées à l'étape (b), comme une molécule d'acide nucléique, une protéine, un peptide, tel qu'un anticorps ou un mélange d'anticorps spécifique(s) d'une protéine et capable(s) de révéler son activité, ou un substrat ou une cascade de substrats, dont l'un est celui de l'enzyme correspondant à la fonction recherchée ou toute molécule chimique ou synthétique ou organique.

[0028] Ainsi, à l'étape (c), la mise en contact de la molécule rapporteur avec les protéines éventuellement exprimées à l'étape (b) peut être réalisée par addition de la molécule rapporteur dans le mélange réactionnel résultant de l'étape (b). Mais la molécule rapporteur peut aussi être présente dans le mélange réactionnel dès l'une des étapes (a) ou (b), soit sous sa forme finale de molécule rapporteur, soit, selon une forme particulière de réalisation de l'invention, sous la forme d'une molécule d'acide nucléique (ADN, ou ARN) correspondant au gène codant pour ladite molécule rapporteur, et alors désigné ci-après gène rapporteur. Dans ce mode de réalisation particulier, la molécule rapporteur sera produite lors de l'étape (b) conjointement avec la ou les protéines correspondant à la fonction recherchée.

[0029] Dans cette forme particulière de mise en oeuvre de la méthode de l'invention, le gène rapporteur est placé sous les mêmes séquences de contrôle de régulation de la transcription et de la traduction que le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée de façon à être coexprimé avec ceux-ci et ainsi permettre à la molécule rapporteur d'être présente lors de l'étape (c). Le gène rapporteur avec ses séquences de régulation de la transcription et de la traduction est présent sous toute forme d'acide nucléique comme un vecteur d'expression *in vitro*.

[0030] A titre d'exemple, le gène rapporteur peut être le gène de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ou celui de la beta-lactamase (TEM-1).

[0031] Dans le cas de la GFP, l'étape (c) comprend la détection et la quantification de l'émission de fluorescence. Ainsi, la méthode de l'invention permet par exemple de réaliser un test tel que la GFP n'est fluorescente que si la séquence cible est absente de l'échantillon d'acide nucléique étudié. Il convient de noter que le gène rapporteur de la GFP présente l'avantage de produire une protéine, dont l'activité est instantanément mesurable, ce qui permet un gain de temps supplémentaire.

[0032] Dans le cas de la beta-lactamase, l'étape (c) comprend la mesure de l'activité de cette enzyme, en incubant une fraction de la réaction de traduction dans un tampon contenant de la nitrocéphine. La nitrocéphine est une beta-lactamine chromogénique qui a la propriété de virer du jaune au rouge lorsqu'elle est hydrolysée par une beta-lactamase active. Un test rouge indique par exemple que la séquence cible est présente dans l'échantillon d'acide nucléique analysé.

[0033] Tout autre gène rapporteur peut être envisagé dans le cadre de la méthode de l'invention, comme par exemple ceux de la beta-galactosidase, la luciférase, la peroxydase ou une microperoxydase etc... Il est à noter qu'un gène rapporteur correspondant à une protéine ayant une activité enzymatique présente une grande sensibilité due au coefficient enzymatique multiplicateur.

[0034] La méthode de l'invention offre donc un grand choix de mode de réalisation à partir de gènes et molécules rapporteurs choisis en fonction de la nature et de l'activité de la ou des protéines correspondant à la fonction recherchée.

[0035] La mesure de l'activité d'une ou plusieurs protéines à l'étape (c) peut être lue directement dans un lecteur de fluorimétrie si la mesure de la fonction met en oeuvre un fluorophore comme par exemple la GFP ou de colorimétrie si la mesure de la fonction met en oeuvre un chromophore comme par exemple la nitrocéphine. Mais on peut également envisager des mesures par absorbance, par viscosimétrie, par spectrophotométrie de masse ou tout autre méthode liée à la mesure de la fonction à l'étape c. Il est tout à fait envisageable de réaliser une lecture en continue de la fonction, si le test fonctionnel s'y prête.

[0036] Comme indiqué précédemment la fonction analysée peut correspondre à une seule protéine ou à plusieurs protéines, comme par exemple dans le cas d'un phénotype exprimé par un opéron. En conséquence, la méthode de l'invention accepte plusieurs formes de réalisation.

[0037] Lorsque la fonction détectée et/ou quantifiée correspond à une seule protéine, la méthode de l'invention comprend les étapes (a) à (c) suivantes :

- a) la préparation, à partir de l'échantillon d'acide nucléique, de molécule d'acides nucléiques comprenant le gène codant pour la protéine correspondant au à ladite fonction en 5' dudit gène un promoteur d'ARN polymérase et

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

un site de fixation des ribosomes, et éventuellement un terminateur d'ARN polymérase en 3' dudit gène,
b) la transcription et la traduction *in vitro* de la molécule d'acide nucléique préparée à l'étape (a), éventuellement en présence d'une ou plusieurs molécules rapporteurs permettant de révéler et/ou de mesurer l'activité, la présence ou l'absence de la protéine correspondant à ladite fonction,
5 c) la mise en contact des protéines éventuellement produites à l'étape (b) avec une ou plusieurs molécules rapporteurs, si celle(s)-ci n'étai(en)t pas présente(nt) à l'étape (b), permettant de révéler et/ou de mesurer l'activité, la présence de la protéine correspondant à ladite fonction.

10 **[0038]** Mais la méthode de l'invention peut aussi être appliquée à la détection et/ou à la quantification d'une fonction correspondant à un ensemble de protéines. Les gènes codant pour ces protéines peuvent être situés sur le même fragment d'ADN comme dans le cas d'un opéron, ou à différents endroits de l'ADN génomique comme dans le cas de certaines voies métaboliques.

15 **[0039]** Lorsque la fonction connue analysée correspond à plusieurs protéines, l'étape (a) de la méthode de l'invention admet les deux formes de mise en oeuvre suivantes :

20 i) Soit, lesdits gènes sont regroupés sous la forme d'un opéron, et alors l'étape (a) consiste à préparer à partir de l'échantillon d'acides nucléiques, une molécule d'acide nucléique comprenant les gènes (l'opéron) codant pour les protéines correspondant à ladite fonction, si ils sont présents dans les acides nucléiques de l'échantillon, en 5' de l'ensemble desdits gènes (de l'opéron) un promoteur d'ARN polymérase, éventuellement en 3' de l'ensemble desdits gènes (de l'opéron) un terminateur d'ARN polymérase, et pour chacun desdits gènes son site de fixation des ribosomes naturel.

25 ii) Soit, lesdits gènes sont séparés et alors l'étape (a) consiste à préparer, à partir de l'échantillon d'acide nucléique, une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant les gènes codant pour les protéines correspondant à ladite fonction, si ils sont présents dans les acides nucléiques de l'échantillon, en 5' de chacun desdits gène un promoteur d'ARN polymérase et un site de fixation des ribosomes, et éventuellement en 3' de chacun desdits gènes un terminateur d'ARN polymérase.

30 **[0040]** Dans la première forme de mise en oeuvre (i) ci-dessus, une mise en oeuvre préférée concerne le site de fixation des ribosomes de chacun des gènes, qui est son site de fixation des ribosomes naturel, et l'on préfère alors utiliser à l'étape (b) un extrait de traduction préparé à partir de l'organisme dont provient l'échantillon d'acides nucléiques ou d'un organisme phylogénétiquement proche.

[0041] Dans la seconde forme de mise en oeuvre (ii) ci-dessus, le site de fixation des ribosomes peut être le site naturel de chacun des gènes ou un autre site de fixation des ribosomes plus adapté à l'étape (b) de traduction.

35 **[0042]** Une variante de la première (i) et deuxième forme (ii) de mise en oeuvre ci-dessus, consiste à réaliser en parallèle ou simultanément, la méthode de l'invention décrite précédemment lorsque la fonction analysée correspond à une seule protéine, chaque étape (a) étant réalisée avec chacun des gènes. Une alternative à la réalisation en parallèle ou simultanée des méthodes de l'invention, consiste à réaliser séparément pour chacun des gènes les étapes (a) et (b), puis, pour la détection et/ou la mesure finale de la fonction impliquant chacune des protéines, à rassembler les produits des étapes (b) pour réaliser l'étape (c).

40 **[0043]** De même, lorsque la fonction analysée correspond à des protéines dont les gènes sont physiquement séparés sur le génome, la méthode de l'invention consiste à réaliser en parallèle ou simultanément, la méthode décrite précédemment lorsque la fonction analysée correspond à une seule protéine, chaque étape (a) étant réalisée avec chacun des gènes. Une alternative à la réalisation en parallèle ou simultanée des méthodes de l'invention, consiste à réaliser séparément pour chacun des gènes, les étapes (a) et (b), puis, pour la détection et/ou la mesure finale de la fonction impliquant chacune des protéines, à rassembler les produits des étapes (b) pour réaliser l'étape (c).

45 **[0044]** L'invention concerne aussi une méthode de quantification d'une fonction connue, à partir des acides nucléiques présents dans ledit échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend :

50 a) à c) la mesure de ladite fonction selon les étapes (a) à (c) ci-dessus, puis

d) la comparaison de la mesure de la fonction éventuellement présente dans l'échantillon effectuée à l'étape (c) avec une valeur étalon ou un ensemble de valeurs étalons de ladite fonction mesuré sur un ou plusieurs échantillons étalons selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c).

55 **[0045]** Un échantillon étalon pour la réalisation de l'étape (d) ci-dessus peut être tout échantillon contenant :

- une quantité, avantageusement connue, du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée par la méthode de l'invention, et qui sera alors soumis à un traitement de transcription traduction comme à l'étape (b), puis la fonction de la ou des protéines obtenue(s) sera mesurée selon un procédé de mesure

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

identique ou équivalent à celui de l'étape (c),

- une quantité, avantageusement connue, de la ou des protéines correspondant à ladite fonction, laquelle sera mesurée selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c),
- une quantité, avantageusement connue, d'un ou plusieurs organismes ou processus possédant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction, laquelle sera mesurée selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c).

[0046] L'échantillon étalon peut provenir d'un milieu identique ou différent de celui sur lequel les étapes (a) à (d) de la méthode de l'invention sont réalisées. Il peut s'agir du même milieu mais prélevé à un moment différent.

[0047] Dans une forme particulière de réalisation de la méthode de détection de l'invention, l'échantillon peut contenir lui-même l'étalon.

[0048] Elle peut être évaluée notamment par rapport à un seuil prédéterminé ou par rapport à une courbe standard permettant la comparaison des mesures de la fonction de l'étape (c) avec celles d'échantillons étalons.

[0049] Dans le cadre des différentes mise en oeuvre de la présente invention, la préparation de l'échantillon à l'étape (a) de la méthode de l'invention consiste à placer une ou plusieurs séquences d'acide nucléique codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée que l'on souhaite détecter ou quantifier sous le contrôle d'éléments nécessaires à la transcription et à la traduction *in vitro*.

[0050] Ainsi, à l'étape (a), les séquences de contrôle du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction détectée et/ou quantifiée selon le procédé de l'invention sont pour la transcription :

- un promoteur d'ARN en 5' du brin codant du ou desdits gènes,
- éventuellement un terminateur d'ARN polymérase en 3',

et pour la traduction :

- un site de fixation des ribosomes qui peut être ou non le(s) site(s) de fixation naturel(s) du ou des gènes.

[0051] Le promoteur (en 5') et le terminateur (en 3') s'il est présent, d'une ARN polymérase, sont par exemple ceux de l'ARN polymérase des phages T7, SP6, Q β ou λ .

[0052] Une forme de mise en oeuvre avantageuse de l'étape (a) de la méthode de l'invention consiste à préparer la ou les molécules d'acide nucléique par une réaction d'amplification du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant au phénotype analysé, à partir de l'échantillon d'acides nucléiques. Il peut s'agir d'une amplification par PCR ou par des techniques dérivés de la PCR du type RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, ou des techniques différentes de la PCR du type NASBA, SDA ou rolling circle et autres. Avantageusement cette préparation met en oeuvre un couple d'oligonucléotides ou un couple d'amorces spécifiques de la ou des molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée. Cette préparation par amplification est réalisée à l'aide d'une ou plusieurs paires d'amorces, chacune constituée pour l'exemple de la PCR (figure 1) et de la NASBA :

- pour l'amorce sens, de la séquence s'hybridant en amont d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée, et d'un promoteur d'ARN polymérase et éventuellement un site de fixation des ribosomes, et
- pour l'amorce antisens, de la séquence s'hybridant en aval d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée, et éventuellement d'un terminateur d'ARN polymérase.

[0053] L'étape (a) peut être réalisée par toute autre technique appropriée. En effet, la préparation de la molécule d'acide nucléique de l'étape (a) peut être réalisée par toute autre méthode connue de l'homme du Métier comme par exemple une coupure de restriction permettant de récupérer le ou les gènes d'intérêt suivie d'une ligation orientée avec les éléments de contrôle nécessaires à la transcription et à la traduction *in vitro* indiqués précédemment.

[0054] Lorsque l'invention concerne la détection ou la quantification d'au moins deux fonctions dans le même échantillon, quelque soit la technique de préparation de la ou des molécules d'acide nucléique l'étape (a), celle-ci peut être mise en oeuvre avec des amorces discriminantes ou non.

[0055] Ainsi, lorsqu'à l'étape (a) on utilise des amorces non discriminantes, alors à l'étape (c) on détecte et/ou l'on mesure lesdites fonctions par des tests fonctionnels permettant de différencier lesdites fonctions.

[0056] Ou, lorsqu'à l'étape (a) on utilise des amorces discriminantes, alors qu'à l'étape (c) on détecte et/ou l'on mesure lesdites fonctions par des tests fonctionnels permettant ou non de différencier lesdites fonctions.

[0057] Dans le cas de l'utilisation de couples d'amorces à l'étape (a) de la préparation de molécules d'acides nucléi-

ques, différentes formes de mise en oeuvre de la méthode de l'invention peuvent être réalisées. Il est possible de combiner dans un seul tube ou non deux réactions de détection, et/ou quantification objet de la méthode de l'invention. L'étape (a) est réalisée alors avec les amorces nécessaires à l'amplification spécifique des gènes cibles. Dans ce cas, deux tests fonctionnels différents peuvent être utilisés pour détecter et/ou quantifier chacune des fonctions. Il est encore possible d'utiliser le même test fonctionnel pour les fonctions, et un résultat positif indique alors uniquement la présence de l'une ou de l'autre des protéines cibles. Il est donc possible d'utiliser autant de tests fonctionnels que de protéines cibles, chaque rapporteur différent permettant de révéler chacune des protéines cibles.

[0058] Il est possible d'utiliser des amorces discriminantes ou non à l'étape (a) et/ou des tests fonctionnels différents ou non à l'étape (c) de la méthode de l'invention (exemple I).

[0059] Des amorces discriminantes permettent d'isoler spécifiquement une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine correspondant à une fonction représentative d'un processus ou d'un organisme, alors que les amorces non discriminantes ne permettent pas forcément d'isoler spécifiquement un gène codant pour une telle fonction.

[0060] Dans le cas de l'utilisation d'amorces non discriminantes à l'étape (a) de la méthode de l'invention, la spécificité du processus ou de l'organisme pourra être déterminée par un test fonctionnel ou par une combinaison de tests fonctionnels réalisés à l'étape (c) de la méthode de l'invention. Les amorces non discriminantes peuvent être universelles ou non, dégénérées ou non. On entend par amorces dégénérées, des amorces qui s'hybrident partiellement à la cible nucléotidique codant pour la protéine correspondant à la fonction recherchée. On entend également par amorces non discriminantes des pools de couples d'amorces discriminantes pour préparer à l'étape (a) la ou les molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction recherchée présente dans un ou plusieurs processus ou un ou plusieurs organismes.

[0061] Il est possible de réaliser la méthode de l'invention en combinant des amorces discriminantes ou non à l'étape (a) avec des tests fonctionnels spécifiques ou non à l'étape (c) pour réaliser la détection et la quantification d'un processus ou d'un organisme. En effet, c'est l'interprétation de ces différents tests qui permet de déterminer la spécificité de la détection.

[0062] La méthode de l'invention permet d'analyser les différentes fonctions correspondant à l'expression de plusieurs mutants d'un même gène pouvant être contenus dans un même échantillon d'acides nucléiques de départ. A titre d'exemple de cette application de la méthode de l'invention, on peut citer les différents mutants du gène de la protéase du VIH contenus dans un échantillon d'un patient infecté par ce virus. La mise en oeuvre de la méthode de l'invention consiste alors à réaliser chaque étape (a) avec chacun des mutants dudit gène de façon à exprimer chacun de ceux-ci séparément. La séparation des mutants contenus dans l'échantillon peut être réalisée par clonage, dilution extrême ou par toute autre méthode connue de l'homme du Métier. Cette application de la méthode de l'invention consiste donc à analyser les différentes formes d'une fonction connue contenue dans un seul échantillon d'acides nucléiques. On entend par différentes formes d'une fonction connue, la manifestation de propriétés comparables, car tous les variants de la protéase du VIH ont une activité protéasique, mais distinguables les unes des autres, puisque chaque variant protéique de la protéase du VIH peut présenter une résistance spécifique à un antiprotéase.

[0063] L'invention se rapporte donc aussi à l'application de la méthode à la détection et/ou la quantification *in vitro* des différentes formes d'une fonction connue dans un échantillon d'acides nucléiques susceptibles de contenir le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ces différentes fonctions. En effet, comme indiqué ci-dessus sur la protéase du VIH, l'échantillon d'un patient infecté par ce virus peut contenir plusieurs variants du virus chacun exprimant une protéase différente. Il est donc intéressant d'effectuer non seulement un diagnostic de la présence du virus par l'intermédiaire de la recherche de la fonction de la protéase du virus conformément à la méthode de l'invention, mais aussi de réaliser une analyse de la représentation des différents variants de cette protéase.

[0064] Sur la base de cet exemple sur le VIH, l'invention permet l'analyse *in vitro* des différentes formes d'une fonction connue correspondant à l'expression de plusieurs variants d'un gène pouvant être contenu dans un même échantillon d'acides nucléiques de départ. Ce but est atteint selon l'invention, en amplifiant éventuellement les différents variants, par exemple par culture cellulaire ou par amplification moléculaire, puis en isolant chaque gène, par exemple par clonage ou par dilution extrême, et en exprimant chacun de ces gènes conformément aux étapes (a) et (b) de la méthode de l'invention, et enfin en révélant de la ou des fonctions recherchées.

[0065] Les réactions de transcription et de traduction (étape b) peuvent être simultanées, ce qui signifie que la phase de traduction est réalisée simultanément avec la transcription, ou décomposée en deux étapes distinctes de transcription et de traduction.

[0066] Le découplage des étapes de transcription et de traduction permet d'optimiser les rendements de chaque étape, et ainsi de produire des quantités plus importantes de protéines, ce qui trouve toute son utilité dans le cas de la détection d'enzymes de faible activité spécifique.

[0067] Ce découplage permet aussi de normaliser la formation des produits à l'étape (b) et de pouvoir comparer ultérieurement les différentes fonctions exprimées.

[0068] Le découplage entre la transcription et la traduction permet également d'éviter les problèmes de dégradation de la matrice ADN par les nucléases si celle-ci a été préparée par PCR. En effet, les composants de la réaction de

transcription sont moins contaminés par des nucléases, contrairement aux extraits de traduction.

[0069] Le découplage permet en outre l'emploi d'extraits de traduction différents selon l'origine de l'ADN criblé. En effet, la phase de traduction du transcrite est avantageusement réalisée avec un extrait de traduction de la même origine ou d'une origine proche de celle de l'échantillon biologique sur lequel est pratiqué le procédé de l'invention. Ainsi, on optimise l'adéquation entre l'origine des signaux de traduction des transcrits et l'extrait cellulaire pour une efficacité de traduction optimale. On peut citer à titre d'exemple l'utilisation d'un extrait de traduction préparé à partir de cellules eucaryotes pour la traduction d'une séquence cible eucaryote ou d'un extrait de traduction préparées à partir de mycobactéries non pathogènes pour la traduction de gènes de Mycobactéries pathogènes tel que l'intéine de RecA de Mycobacterium tuberculosis. Dans un autre cas de figure, l'extrait de traduction est préparé à partir d'organismes extrêmophiles pour la traduction d'un gène d'un même organisme ou d'un autre organisme extrêmophile du même type (thermophiles, halophiles, acidophiles, etc...). Ces extraits respectifs sont susceptibles d'améliorer l'efficacité du procédé. Ces extraits sont choisis pour leur capacité à traduire les transcrits.

[0070] Le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il met en oeuvre une adéquation entre la ponctuation d'expression des transcrits et les extraits de traduction utilisés. Ces extraits sont aussi caractérisés en ce que soit ils ne contiennent pas la propriété recherchée, soit ils la contiennent mais qu'elle n'est pas détectable dans les conditions de test réalisées pour détecter la fonction recherchée. Il s'agit par exemple de l'utilisation d'un extrait de traduction contenant une activité beta-galactosidase mésophile permettant de traduire un ARNm d'une beta-galactosidase thermophile et de la détection de l'activité de cette dernière à haute température, ce qui élimine l'activité beta-galactosidase mésophile.

[0071] En fonction de l'origine génétique des molécules d'acide nucléique préparées à l'étape (a), par exemple ADN de microorganismes Gram positifs, ou négatifs, d'eucaryotes, de virus etc..., et de la fonction testée, différents extraits de traduction peuvent donc être utilisés.

[0072] Une mise en oeuvre particulière du procédé de l'invention consiste à utiliser à l'étape (b) un extrait de traduction qui soit en fait un mélange de plusieurs extraits de traduction. Il peut s'agir par exemple d'extrait de traduction de E. coli surexprimant une protéine chaperon A mélangé avec un extrait de traduction de E. coli surexprimant une protéine chaperon B. Tout type de mélange est envisageable du moment qu'il correspond aux caractéristiques décrites ci-dessus. De la même manière, il est possible d'utiliser un extrait de traduction dans lequel est rajouté un ou plusieurs tRNAs spécifiques d'un ou de plusieurs codons. Les extraits de traduction ainsi obtenus permettent alors de traduire des mRNA comportant ces codons spécifiques, comme par exemple la traduction d'un mRNA contenant un codon ambre en rajoutant dans l'extrait de traduction un ou des tRNAs supprimeurs.

[0073] Le traitement de l'étape (b) avec un extrait de traduction peut aussi être réalisé avec un extrait standard de traduction quelque soit l'origine de l'échantillon comme par exemple un extrait d'E. coli et/ou tout(s) autre(s) extrait(s) cellulaire(s) supplémentés ou non par des molécules intéressantes comme celles, par exemple, indiquées précédemment (tRNA, chaperon...).

[0074] Il est également possible d'ajouter à l'extrait de traduction de l'étape (b) une ou plusieurs substances favorisant un repliement ou une maturation plus efficace des protéines exprimées, comme par exemple des chaperons, des détergents, des sulfobétaïnes, des extraits membranaires, etc... .

[0075] Dans le cas où la séquence cible est de type eucaryote, la réaction de transcription de l'étape (b) peut être complétée par une réaction de splicing et de maturation *in vitro* des ARNm en ajoutant un extrait nucléaire au mélange réactionnel.

[0076] Dans le cas particulier où le gène rapporteur est coexprimé avec la ou les protéines codant pour la ou les fonctions, la réaction de transcription et de traduction de l'étape (b) est standardisée de façon à éviter des résultats correspondant à des faux positifs ou à des faux négatifs :

- d'une part, pour que la protéine cible codant pour la fonction ait le temps d'agir au niveau de la mesure de la fonction à l'étape (c) comme par exemple d'agir sur le rapporteur pour l'inhiber par exemple, ou pour éviter de se placer dans des conditions où le rapporteur serait en plus grande quantité que la protéine cible.
- d'autre part, pour se placer dans des conditions d'activité à la fois pour la protéine cible (correspondant à la fonction) et le rapporteur si il est nécessaire au test de mesure à l'étape (c)."

[0077] La méthode de détection et/ou de quantification d'une fonction connue objet de l'invention est remarquable en ce qu'elle permet d'éviter les faux positifs dus à des interférences des composés présents dans l'échantillon de départ lors de la détection et/ou la mesure de la fonction analysée à l'étape (c). En effet, du fait du principe même de la méthode de l'invention, les interactions potentielles des composés du milieu initial sur la détection et/ou la quantification de la fonction à détecter et/ou quantifier sont réduites (par exemple par dilution dudit milieu initial au fur et à mesure des différentes étapes du procédé de l'invention, mais surtout par la spécificité du test fonctionnel utilisé à l'étape (c) du procédé de l'invention). En outre, la méthode de l'invention s'attachant à détecter et/ou quantifier une fonction, toutes les molécules d'acide nucléique codant pour des protéines non fonctionnelles ou toutes les molécules

d'acide nucléique présentant des homologies de séquence avec la séquence recherchée mais codant pour une fonction différente ne seront pas détectés, ce qui est un des avantages majeurs de la méthode de l'invention par rapport aux techniques de l'art antérieur.

[0078] La méthode de l'invention offre l'avantage de pouvoir détecter spécifiquement une ou plusieurs séquences cibles dans un échantillon à analyser et de travailler ultérieurement directement sur cette ou ces séquences cibles. La sensibilité de cette méthode s'explique par le coefficient multiplicateur des étapes (b) et (c) correspondant respectivement à la transcription, à la traduction du ou des gènes préparés à l'étape (a) puis à la détection et/ou la mesure de la fonction correspondant à la ou aux protéines produites à l'étape (b). De plus, pour augmenter la sensibilité, la méthode de l'invention peut passer après l'étape de transcription par une étape d'amplification des transcrits par toute technique connue de l'homme de métier comme la NASBA (nucleic Acid Sequence-based Amplification), la TMA (Transcription Mediated Amplification) avant l'étape de traduction. La méthode de l'invention est en outre rapide et reproductible, car toutes les réactions sont réalisées *in vitro*, ce qui permet de standardiser la détection et de s'affranchir de tous les problèmes liés aux tests de diagnostic *in vivo*, comme la diffusion membranaire, la toxicité cellulaire ou l'état physiologique des cellules.

[0079] Il convient de remarquer que dans cette application de la méthode de l'invention, la fonction recherchée est mise en évidence grâce à l'activité de la protéine cible qui est exprimée *in vitro*. Dans ce cas, la méthode de l'invention permet non seulement de mettre en évidence la présence d'une ou plusieurs fonctions d'un processus ou d'un organisme, mais aussi de caractériser l'activité de la ou des protéines correspondantes. Cette caractérisation, peut être aussi désignée phénotypage de la protéine ou des protéines exprimées selon le procédé de l'invention, par opposition à la génomique qui est la caractérisation de la composition en acides nucléiques de la séquence cible. Le diagnostic de séquences cibles correspond alors également au diagnostic de la fonction et à sa caractérisation. On entend par exemple par caractérisation, la définition du spectre d'inhibition d'une protéine cible par des inhibiteurs spécifiques ou la définition d'une gamme de pH dans laquelle la protéine cible est active. Si la fonction est une activité enzymatique, il peut s'agir de l'analyse des conditions optimales de fonctionnement (pH, température, concentration en sels), des paramètres cinétiques (V_m , K_m), des paramètres d'inhibition (K_i). Si la fonction est une affinité, il peut s'agir de la détermination du K_d , ou de la molécule ayant le plus d'affinité pour cette protéine. Il peut s'agir encore de la détermination de la taille de la protéine traduite ou de l'ARNm transcrit, et éventuellement du séquençage du gène correspondant.

[0080] A titre d'exemple, cette méthode présente un intérêt tout particulier dans le diagnostic de la protéine cible correspondant à la protéinase à acide aspartique du virus HIV pour étudier consécutivement sa sensibilité à différents inhibiteurs spécifiques de protéinases ou antiviraux, lorsque la séquence cible correspondante est présente dans un échantillon d'acide nucléique.

[0081] La caractérisation d'une fonction représente la détermination des caractéristiques de la dite fonction et en particulier l'identification de substance(s) capable(s) de modifier ladite ou lesdites fonction(s). On entend par substance des polynucléotides, des peptides, des protéines, les ions, des molécules ou des compositions chimiques naturelles ou synthétiques, des hormones, des composés aromatiques, des anticorps, des fragments d'anticorps, des gènes, des récepteurs cellulaires, des acides aminés, des glycopeptides, des lipides, des glycolipides, des sucres, des polysaccharides, etc... , capables de modifier l'activité d'une ou plusieurs fonctions d'un organisme ou d'un processus. Ces dites substances pourront correspondre à une ou plusieurs têtes de séries. Il peut s'agir de tout agent capable de modifier la ou les fonctions comme des antiviraux, des inhibiteurs, des stimulants, des conditions physico-chimiques, des radiations ou des traitements thermiques. Cette caractérisation peut se faire en série avec la détection et/ou la quantification ou de manière séquentielle. Cette caractérisation de fonction permet d'effectuer des analyses statistiques. En effet, après avoir identifié différentes fonctions ou différents variants fonctionnels, il est possible d'étudier individuellement par exemple leur résistance à une ou plusieurs substances. Cette forme de mise en oeuvre de la méthode de l'invention est avantageusement réalisée sur une plaque de microtitration ou sur une puce pour étudier par exemple le comportement de différents variants génétiques de la fonction protéinase à acide aspartique de HIV1 vis-à-vis de plusieurs antiviraux.

[0082] En conséquence, la méthode de l'invention peut comprendre après l'étape (c), un test de ladite fonction avec une substance.

[0083] La détection et/ou la quantification de différentes fonctions présentes dans un échantillon selon la méthode de l'invention présentent un avantage certain dans le suivi d'un organisme ou d'un processus. En effet, la méthode de l'invention permet de détecter et/ou de quantifier par exemple les fonctions d'un virus et d'un composant cellulaire. Cette mise en oeuvre de l'invention trouve par exemple un intérêt tout particulier dans la détection et/ou la quantification de la présence d'un pathogène dans un organisme (virus ou bactérie), qui peut (peuvent) être corrélé(es) à la détection et/ou la quantification d'une fonction spécifique dudit organisme infecté ou de la réponse à l'infection de l'organisme infecté (par exemple production de l'alpha-1 acid glycoprotéine (AAG) dans le cas de l'infection par le virus du HIV).

[0084] La méthode de l'invention permet en outre d'effectuer des suivis d'une ou plusieurs fonctions dans différents échantillons. A titre d'exemple, on peut citer le suivi des différents variants fonctionnels de différentes fonctions carac-

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

téristiques d'une infection par le virus HIV. L'apparition des différents variants fonctionnels est caractéristique des phénomènes de résistances à un ou plusieurs antiviraux. Selon le développement de cette résistance, différents tissus porteront différents variants génétiques du virus. Le suivi des différents variants génétiques dans différents tissus donne alors une indication de la propagation de l'infection. Selon les résultats de détection des différents variants génétiques dans différents tissus, le médecin pourra juger de l'état immunitaire d'un patient et de sa capacité à lutter contre des maladies opportunistes et envisager pour son malade outre un traitement par des antiviraux, un traitement par des antibiotiques et ou des antifongiques.

[0085] Compte tenu de la facilité, du faible coût et de la rapidité de la méthode de l'invention, un suivi de la ou des fonctions peut être mis en oeuvre de manière à effectuer périodiquement la détection et la quantification de la ou des dites fonctions. La comparaison des résultats obtenus à différents temps et leur interprétation permet un suivi dans le temps de l'évolution d'un processus.

[0086] Ces différents suivis permettent au praticien de comprendre le développement d'un processus ou d'un organisme. L'interprétation des résultats permettra au praticien qui met en oeuvre le procédé de l'invention de prendre une décision.

[0087] Les étapes du procédé de l'invention peuvent être réalisées successivement ou non sans interruption ou non par le même opérateur. Il peut être réalisé sur un dispositif automatisé intégrant chacune des étapes, ou peuvent être réalisées de façon discontinues, éventuellement par des opérateurs différents. Les échantillons d'acides nucléiques peuvent être alors placés sur un support pouvant correspondre par exemple à une biopuce ou une plaque de microtitration contenant plusieurs dizaines à plusieurs milliers d'emplacements. Ces supports sont conçus pour permettre :

- la préparation des séquences cibles (étape a),
- l'initiation des réactions de transcription et de traduction (étape b) et pour la révélation de la molécule rapporteur (étape c).

[0088] L'invention peut aussi être réalisée à l'aide d'un kit.

[0089] Dans une première forme de réalisation ce kit comprend : les moyens de révélation de la fonction, une ARN polymérase, des séquences nucléotidiques pour la préparation des molécules d'acides nucléiques comprenant le ou les gènes permettant l'expression de la ou des protéines correspondant à la fonction détectée et/ou quantifiée, les quatre nucléotides triphosphates, les mélanges nécessaires à ladite préparation, à la transcription et à la traduction, éventuellement des témoins.

[0090] Dans une seconde forme de réalisation ce kit comprend :

- éventuellement les produits nécessaires à la préparation des molécules d'acides nucléiques comprenant le ou les gènes permettant l'expression de la ou des protéines correspondant à la fonction détectée et/ou quantifiée,
- tout support comme plaque de microtitration ou puce contenant : les moyens de révélation de la fonction, une ARN polymérase, les quatre nucléotides triphosphates, les mélanges de transcription et de traduction, éventuellement des témoins.

[0091] Les kits et les supports peuvent être envisagés pour la détection et/ou la quantification simultanément ou non d'une ou plusieurs fonctions correspondant à un ou plusieurs processus ou un ou plusieurs organismes.

[0092] Un support présentant une série d'emplacements peut être utilisé pour la mise en oeuvre d'une méthode de l'invention, caractérisé en ce que chacun desdits emplacements permet la détection et/ou la mesure d'une fonction différente.

[0093] D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples de réalisation de l'invention, qui suivent et qui se réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 est une représentation schématique de la méthode de l'invention.
- La figure 2 est une représentation schématique de l'application de la méthode de l'invention au diagnostic du virus HIV.
- La figure 3 est une représentation schématique de l'application de l'invention au diagnostic de Mycobacterium tuberculosis.
- La figure 4 représente la détection de l'activité totale ou de l'activité des germes polyrésistants par la méthode de l'invention.
- La figure 5 représente la détection de la charge virale par la méthode de l'invention.
- La figure 6 représente la caractérisation de l'effet d'un inhibiteur sur un échantillon positif par rapport à un témoin négatif par la méthode de l'invention.

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

Exemple I : Exemples de mises en oeuvre de la méthode de l'invention avec différents couples d'amorces à l'étape (a) de préparation et/ou différents tests fonctionnels à l'étape (c) de détection et de quantification d'une ou plusieurs fonctions.

5 **[0094]** Les cas ci-après permettent d'illustrer différentes possibilités de la méthode de l'invention.

1) Cas No. 1 : Les amorces utilisées à l'étape (a) du procédé de l'invention permettent de détecter et de quantifier l'activité reverse transcriptase du virus HIV.

10 Le tableau 1 ci-dessous montre que l'utilisation d'amorces discriminantes à l'étape (a) de la méthode de l'invention permet de détecter par un test fonctionnel à l'étape (c) :

- L'absence de la fonction reverse transcriptase dans l'échantillon 3, donc l'absence du virus HIV.
- La présence de la fonction reverse transcriptase dans les échantillons 1 et 2, donc la présence du virus HIV dans les échantillons 1 et 2. Le virus HIV est présent en plus grande quantité dans l'échantillon 2 que l'échantillon 1.

Tableau 1

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Amorces discriminantes utilisées à l'étape (a)	+	+++	-

2) Cas n° 2 : Des amorces non discriminantes sont utilisées à l'étape (a) de la méthode de l'invention pour détecter dans chaque échantillon la présence potentielle d'une activité reverse transcriptase.

25 Le tableau 2 ci-dessous montre que l'utilisation d'amorces non discriminantes à l'étape (a) de la méthode de l'invention permet de détecter par un test fonctionnel à l'étape (c) :

- L'absence de fonction reverse transcriptase dans l'échantillon 3, donc l'absence de virus.
- La présence de la fonction reverse transcriptase dans les échantillons 1 et 2, donc la présence de virus possédant une fonction reverse transcriptase dans les échantillons 1 et 2. La fonction reverse transcriptase est présente en plus grande quantité dans l'échantillon 2 que l'échantillon 1.

Le tableau 2 ci-dessous montre aussi que l'utilisation d'amorces discriminantes à l'étape (a) de la méthode de l'invention permet de détecter par un test fonctionnel à l'étape (c) :

- La présence d'HIV dans l'échantillon 1.
- La présence d'HBV dans l'échantillon 2.

Tableau 2

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Amorces non discriminantes	+	+++	-
Amorces spécifiques de la RT d'HIV	+	-	-
Amorces spécifiques de la RT d'HBV	-	+++	-

3) Cas n° 3 : Des tests fonctionnels différents sont mis en oeuvre à l'étape c du procédé de l'invention pour détecter une polymérase en fonction de sa thermorésistance.

50 Le tableau 3 ci-dessous montre que la méthode de l'invention permet de détecter par différents tests fonctionnels à l'étape (c) :

- La présence d'une polymérase préférentielle active à 100°C dans l'échantillon 1.
- La présence d'une polymérase active à 60°C dans l'échantillon 2.
- La présence d'une polymérase uniquement active à 100°C dans l'échantillon 3.

55

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

Tableau 3

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Test fonctionnel à 60 °	+	+++	-
Test fonctionnel à 100 °	++++	+	+++

4) Cas n° 4 : Un test fonctionnel peut être réalisé en présence de différents substrats pour détecter et quantifier les différentes fonctions présentes dans un échantillon. Ce test fonctionnel peut permettre par exemple de détecter une activité polymérase.

Le tableau 4 ci-dessous montre que la méthode de l'invention permet de détecter par un test fonctionnel réalisé à l'étape (c) :

- La présence d'une activité ADN polymérase ADN dépendante et ARN dépendante dans l'échantillon 1.
- La présence d'une activité ADN polymérase ADN dépendante dans l'échantillon 2.
- La présence d'une activité ADN polymérase ARN dépendante dans l'échantillon 3.
- Le test fonctionnel en l'absence de substrat est un témoin négatif permettant de valider la détection.

Tableau 4

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Test fonctionnel + ADN	+	+	-
Test fonctionnel + ARN	+	-	+
Test fonctionnel sans substrat	-	-	-

5) Cas n° 5 : Ce cas représente par exemple la détection du virus HIV dans des échantillons 1, 2 et 3 sanguins. Deux tests fonctionnels sont réalisés pour contrôler la spécificité de notre détection.

Le tableau 5 ci-dessous montre que L'utilisation de pool d'amorces discriminantes à l'étape a) de la méthode de l'invention sur différents échantillons sanguins permet de détecter par des tests fonctionnels différents réalisés à l'étape (c) :

- La présence d'HIV dans l'échantillon 1
- L'absence d'HIV dans l'échantillon 3
- Une erreur dans l'échantillon 2

Tableau 5

	Test fonctionnel permettant de révéler l'activité réverse transcriptase	Test fonctionnel permettant de révéler l'activité protéinase à acide aspartique
Test 1	+	+
Test 2	+	-
Test 3	-	-

6) Cas n° 6 : Ce cas concerne la détection et la quantification des microorganismes suivants

- *Aeromonas hydrophila* se caractérise par les activités ONPG, LDC, ESC, OX.
- *Escherichia coli* 1 se caractérise par ONPG, LDC, ODC, UE.
- *Salmonella arizonae* se caractérise par ONPG, LDC, ODC.
- *Vibrio alginolyticus* se caractérise par LDC, ESC, OX.

Le tableau 6 ci-dessous montre que l'utilisation de pool d'amorces discriminantes à l'étape (a) de la méthode de l'invention sur différents échantillons permet de détecter par des tests fonctionnels différents à l'étape (c) et en fonction de différentes cartes d'identité fonctionnelles de microorganisme :

- La présence d'*aeromonas hydrophila* dans l'échantillon a.

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

- La présence d'E. coli 1 dans l'échantillon b.
- L'absence de microorganisme dans l'échantillon c
- La présence de Vibrio alginolyticus dans l'échantillon d
- La présence de Salmonella arizonae dans l'échantillone.

5

Tableau 6

	ONPG	LDC	ODC	UE	ESC	OX
Echantillon a	+++	+	-	-	+	+++
Echantillon b	+++	+++	++	+	-	-
Echantillon c	-	-	-	-	-	-
Echantillon d	-	+	-	-	++	+++
Echantillon e	+++	+++	+++	-	-	-

10

15

On entend dans le tableau 6 par :

- ONPG : beta D- galactosidase
- LDC : Lysine décarboxylase
- ODC : Ornithine décarboxylase
- URE : uréase
- ESC : beta-galactosidase
- OX : cytochrome oxydase

20

25

Exemple II : Diagnostic du virus HIV.

[0095] Parmi les protéines virales nécessaires au cycle de multiplication du virus du HIV, on peut noter la protéinase à acide aspartique. La présence de cette protéine peut servir à diagnostiquer l'infection d'un patient par le rétrovirus.

30

[0096] Comme montré à la figure 2, après une extraction des acides nucléiques d'un prélèvement sanguin, une étape d'amplification permet d'amplifier le gène de la protéinase à acide aspartique de HIV si le patient est infecté par le virus et d'intégrer le promoteur, le terminateur de la T7 ARN polymérase et un site RBS à la séquence cible.

[0097] La molécule rapporteur préparée à l'étape (a) est un peptide contenant des sites de coupure spécifiques de la protéinase de HIV. Ce peptide est lié covalamment respectivement en N et C terminal à une molécule fluorescente (comme par exemple la fluoresceïne) et à un quencher de cette dernière (comme par exemple la rhodamine).

35

[0098] Le gène cible amplifié est placé dans un tube chargé avec un mélange de transcription/traduction couplé (composants nécessaires à la transcription et à la traduction). Puis on ajoute la molécule rapporteur. Avantagement, le milieu réactionnel de transcription et de traduction est composé soit d'un extrait cellulaire de traduction de E. coli, soit d'un extrait cellulaire de traduction de cellules eucaryotes.

40

[0099] Si la protéinase à acide aspartique est absente de l'échantillon testé, le rapporteur n'est pas clivé. La fluoresceïne et la rhodamine se trouvent alors dans un environnement suffisamment proche pour assurer un transfert d'énergie de type FRET (fluorescence resonance energy of transfert). Après exposition du peptide rapporteur à une longueur d'onde donnée (environ 490 nm), seule la fluorescence rouge du quencher sera détectable.

45

[0100] Si la protéinase à acide aspartique est présente dans l'échantillon testé, le rapporteur est clivé. La fluoresceïne et la rhodamine sont alors trop éloignés pour assurer un transfert d'énergie. Après exposition des produits de clivage à une longueur d'onde donnée (environ 490 nm), seule la fluorescence verte de la fluoresceïne est détectable.

[0101] Des témoins négatif et positif sont réalisés en parallèle. Il correspondent respectivement à une fraction d'une réaction PCR réalisée sur de l'ADN d'un patient sain et d'un patient infecté.

50

[0102] Après avoir diagnostiqué la présence du virus chez un patient, cette méthode permet un test consécutif de caractérisation de la protéinase à acide aspartique : selon la souche responsable de l'infection virale, la protéinase à acide aspartique présente une sensibilité variable à différents inhibiteurs spécifiques. Un tel phénotypage de la protéinase à acide aspartique permettra d'adapter la thérapie du patient directement après le diagnostic de l'infection virale. Pour cela, il suffit d'incuber une fraction de la réaction d'amplification dans différentes réactions de transcription/traduction, chacune contenant un inhibiteur spécifique de protéinase à acide aspartique utilisé actuellement dans des thérapies antivirales, et d'effectuer ensuite le test d'activité de la protéinase à acide aspartique avec le peptide FRET.

55

Exemple III : Diagnostic de Mycobacterium tuberculosis.

[0103] Les méthodes classiques de diagnostic de la tuberculose et des infections mycobactériennes reposent sur l'examen microscopique et sur la culture des échantillons. Pour palier à la lenteur du diagnostic classique, de nouvelles techniques ont été développées.

[0104] Dans le cadre de la méthode de l'invention, le diagnostic du pathogène est réalisé en utilisant par exemple comme cible une de ses intéines. Les intéines sont des introns protéiques récemment découverts à l'intérieur de séquences protéiques. Les intéines possèdent toute l'information nécessaire à leur propre excision. Ce processus récemment mis en évidence est comparable à l'épissage des ARN prémessagers. Ainsi, par convention, la séquence protéique interne est appelée intéine et les deux séquences externes, extéines (Perler, F.B., Davis E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J. et Belfort, M. (1994). Protein splicing éléments : inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature. Nucl. Acids Research 22, 1125-1127). Ce phénomène d'excision protéique spécifique est très rapide. Ces intéines ont été découvertes dans des groupes de gènes très différents et elles sont à la fois présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. La protéine RecA de Mycobacterium tuberculosis contient un tel élément. D'autres Mycobactéries pathogènes peuvent posséder de telle séquence dans RecA comme Mycobacterium Leprae. Néanmoins, ces deux introns protéiques sont différents en taille, en séquence et dans leur localisation, ce qui les rend très spécifiques (Davis, E.O., Thangaraj, H.S., Brooks, P.C. et Colston, M.J. (1994). Evidence of selection for protein introns in the recAs of pathogenic mycobacteria. EMBO J. 13 (4), 699-703). En outre, ces intéines peuvent posséder une activité endonucléase, capable de reconnaître spécifiquement un mé-gasite.

[0105] Le test montré à la figure 3 est le suivant. Après extraction de l'ADN de l'échantillon à analyser, une PCR permet d'amplifier le gène cible codant pour l'intéine en lui intégrant le promoteur, le terminateur de la T7 ARN polymérase et un site RBS. Le produit de PCR est ensuite incubé dans un mélange de transcription/traduction. Le rapporteur est ensuite ajouté. Ce rapporteur correspond à une séquence polynucléotidique caractérisé par la présence en 5' et en 3' respectivement d'une molécule de fluoresceine et de Rhodamine liées de façon covalente à l'ADN et en son centre du site de coupure spécifique de l'intéine de RecA de Mycobacterium tuberculosis.

[0106] Lorsque l'échantillon est contaminé par Mycobacterium tuberculosis, l'intéine produite dans la réaction de transcription/traduction, clive le rapporteur et empêche un transfert d'énergie de type FRET (décrit dans l'exemple précédent). Après exposition de la réaction de transcription/traduction à environ 490 nm, une coloration verte de l'échantillon est observée. En absence de contamination, le rapporteur n'est pas clivé et après exposition de la réaction de transcription/traduction à environ 490 nm, une coloration rouge de l'échantillon est observée.

[0107] Un témoin négatif est constitué d'une fraction de réaction PCR réalisée sur de l'ADN ne contenant aucun pathogène. Un témoin positif est constitué d'un fraction de réaction PCR réalisées sur de l'ADN d'un échantillon contaminé par le pathogène recherché.

Exemple IV : Détection spécifique d'un élément au sein d'un échantillon contenant des éléments similaires.

1) Détection spécifique d'un élément au sein d'un échantillon contenant des éléments similaires.

[0108] Les β -lactamines (pénicillines et céphalosporines) représentent la classe d'antibiotiques la plus utilisée en thérapie anti-infectieuse. Depuis l'introduction en thérapie de ces molécules, de nouvelles résistances à ces composés se développent, favorisant l'expansion des infections nosocomiales. Parmi les différents mécanismes de résistance acquis par les germes, un des plus importants consiste à produire une enzyme (β -lactamase TEM-1 (Sutcliffe J.G., 1978, Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of Escherichia coli plasmid pBR322, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3737-3741) pour certaines entérobactéries par exemple, ou beta-lactamase PSE pour Pseudomonas aeruginosa) capable d'hydrolyser l'antibiotique avant qu'il n'ait pu agir. Il existe quelques inhibiteurs de β -lactamases utilisés en synergie avec un antibiotique, mais au fur et à mesure de leur utilisation de nouvelles formes de β -lactamases résistantes à ces inhibiteurs sont apparues.

[0109] La détection de la fonction de ces enzymes représente donc un excellent test de diagnostic de la présence de germes résistants aux antibiotiques. D'autre part, la détection spécifique de beta-lactamases résistantes aux inhibiteurs est particulièrement avantageuse, car elle permet de savoir directement si un échantillon est contaminé par des germes polyrésistants (antibiotiques et inhibiteurs), ce qui permet d'adapter rapidement la thérapie.

[0110] Cette expérience permet la détection spécifique de germes polyrésistants (résistance aux antibiotiques et résistance à un inhibiteur de beta-lactamase : l'acide clavulanique) exprimant un variant résistant de TEM-1, dans un échantillon contaminé par des germes monorésistants (résistance uniquement aux antibiotiques).

[0111] 10 μ l de culture à DO600=2.3 ont été centrifugés et chaque culot a été repris dans 12 μ l de tampon de lyse cellulaire (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 μ g/ml protéinase K) et incubé 15 minutes à 55°C puis 15 minutes à 80°C. 9 μ l de chacun de ces lysats ont été ajoutés à un mélange d'amplification PCR permettant d'amplifier le gène

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

conférant la monorésistance et le gène conférant la polyrésistance ainsi que les séquences permettant leur expression *in vitro*. 5 µl de chaque amplification PCR ont été utilisés pour réaliser une transcription *in vitro* comme décrit par Gurevich et al. (Gurevich V.A., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A. et Zozulya S., 1991, Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 polymerases, Anal. biochem., 195, 207-213) 10 µl de chaque transcription ont été utilisés pour traduire *in vitro* les protéines comme décrit par Zubay (Zubay G., 1973, *In vitro* synthesis of protein in microbial systems, Ann. Rev. Genet., 7, 267-287) sur un volume final de 100 µl.

Tableau 8

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7
% de germes résistants aux antibiotiques	100	90	70	50	30	10	0
% de germes résistants aux antibiotiques et à l'acide clavulanique	0	10	30	50	70	90	100

[0112] Deux types de tests d'activité ont été effectués :

- une mesure de l'activité "totale" bêta-lactamase en utilisant comme substrat un antibiotique chromogénique : la nitrocéphine. 10 µl du mélange de traduction ont été incubés à 37°C dans un volume final de 1 ml de tampon de révélation de l'activité (concentration finale : NaP 50mM pH 7.0, 100µg/ml de nitrocéphine et 0.25 mM DMSO). La réaction a été suivie par spectrophotométrie à 486 nm.
- une mesure de l'activité "résistance à l'acide clavulanique" en utilisant comme substrat un antibiotique chromogénique : la nitrocéphine plus une concentration donnée d'acide clavulanique. 10 µl du mélange de traduction ont été incubés à 25°C pendant 3 minutes dans un volume final de 1 ml de tampon I (concentration finale : NaP 50mM pH 7.0, 1 µM d'acide clavulanique). Puis 100µg/ml de nitrocéphine et 0.25 mM final de DMSO ont été rajoutés, et la réaction a été suivie par spectrophotométrie à 486 nm.

[0113] Les résultats sont exposés dans le tableau 8 qui indique la composition des échantillons.

[0114] La figure 4 indique que l'activité totale beta-lactamase est détectée dans tous les échantillons avec un niveau comparable d'activité : le test permet donc de détecter simultanément deux fonctions (résistante aux antibiotiques et polyrésistance antibiotiques/acide clavulanique).

[0115] Lorsque le test de détection est réalisé en présence d'acide clavulanique, aucune activité n'est détectée dans l'échantillon 1 (0% de germes ayant la double résistance), et une activité croissante est détectée pour les échantillons 2 à 7 contenant de 10 à 100 % de germes ayant la double résistance. Ce test de détection fonctionnel est donc hautement discriminant puisqu'il permet de détecter l'activité des germes polyrésistants au sein d'une population de germes monorésistants.

[0116] Il est à noter que la différence entre l'activité totale détectée dans un échantillon et celle détectée uniquement pour les germes polyrésistants n'est pas égale à l'activité des germes monorésistants, car les enzymes de ces deux types de germes n'ont pas la même activité spécifique. En connaissant ces activités spécifiques, il serait possible de faire cette corrélation et de déduire l'activité des germes monorésistants en connaissant juste l'activité totale et celle des germes polyrésistants.

[0117] La méthode de l'invention permet donc :

- de réaliser une discrimination par la fonction (révélation de la fonction résistance à l'acide clavulanique)
- de s'affranchir du bruit de fond (détection spécifique d'une population de germes au sein d'une population de germes similaires)
- de caractériser un échantillon : le premier test fonctionnel révèle que les échantillons 2 à 7 par exemple sont positifs, et le deuxième test fonctionnel permet de révéler qu'ils contiennent des germes polyrésistants.

[0118] De manière beaucoup plus classique il est envisageable de discriminer deux fonctions identiques (fonction protéase de HBV et fonction protéase de HIV) par une amplification spécifique du ou des gène(s) d'une de celles-ci (utilisation par exemple d'amorces de PCR spécifiques du gène de la protéase de HIV pour la détecter au sein d'un échantillon pouvant contenir aussi le gène de la protéase de HBV). Dans ce cas de figure le test fonctionnel n'est pas nécessairement discriminant.

2) Détection du virus HIV-1 par l'intermédiaire de sa fonction protéase.

[0119] La charge virale de HIV-1 est mesurée dans différents échantillons.

[0120] Les étapes a et b du procédé de l'invention ont été réalisées. La détection de l'activité (étape c) de la protéase

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

a été réalisée en incubant à 37°C 10 µl de chacune de ces traductions (étape b) avec 60 µl de tampon (2M NaCl, 12 mM EDTA, 200 mM acétate de sodium, 2 mM DTT et 20% DMSO) et 10 µM final du peptide substrat BACHEM M1865 (peptide DABCYL-γ-Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS) sur un volume final de 120 µl. Ce peptide FRET a pour propriété de libérer de la fluorescence lorsqu'il est clivé par la protéase du virus HIV. Un diagnostic positif se caractérise donc par l'apparition d'un signal fluorescent lorsqu'il est exposé aux UV.

[0121] La figure 5 illustre les signaux obtenus pour les différents échantillons prélevés au cours du temps. Les intensités de fluorescence obtenues pour les différents signaux positifs correspondent aux différentes charges virales. En se référant à une gamme étalon, il est donc possible de quantifier le signal mesuré et d'en déduire la quantité de virus dans chaque échantillon.

[0122] Une fois qu'un échantillon est détecté comme étant positif, le diagnostic par le procédé de l'invention permet de caractériser la fonction détectée. La figure 5 illustre l'effet de concentrations croissantes d'un inhibiteur de la protéase HIV (inhibiteur non thérapeutique : la pepstatine A) sur l'activité de la protéase de l'échantillon.

[0123] Pour cela, 10 µl d'une traduction correspondant à un échantillon ont été incubés à 37°C avec 60 µl de tampon (2M NaCl, 12 mM EDTA, 200 mM acétate de sodium, 2 mM DTT et 20% DMSO), 10 µM du peptide substrat BACHEM M1865 (peptide DABCYL-γ-Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS) et 0 ou 500nM ou 1µM ou 10µM ou 30µM ou 60µM ou 80µM ou 100µM final de pepstatine A sur un volume final de 120 µl. La lecture a été réalisée par fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et d'émission de 490 nm.

[0124] Une corrélation entre la diminution de l'activité et l'augmentation des concentrations croissantes en inhibiteur peut être observée.

[0125] En fixant un seuil de sensibilité (ou de résistance) (par exemple 50% de l'activité perdue pour une incubation de 30 minutes avec 50 mM d'inhibiteur), il est possible de déterminer si cette protéase est sensible ou non aux inhibiteurs de protéase existant, et d'adapter en direct une thérapie relative à l'échantillon prélevé.

[0126] Ceci démontre que la méthode de l'invention permet de détecter, quantifier et caractériser une fonction d'un organisme ou d'un processus à partir d'un seul échantillon.

[0127] Ces expériences peuvent être réalisées avec tout type de fonctions spécifiques d'organismes différents, ou d'un même organisme, ce qui permet alors de caractériser différentes cibles thérapeutiques (détection et caractérisation simultanées de la protéase et de la reverse transcriptase du virus HIV par exemple).

Revendications

1. Méthode de diagnostic de la présence d'un organisme ou du développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules, dans un échantillon biologique, **caractérisée en ce que** l'on détecte et/ou mesure la fonction d'une ou plusieurs protéines spécifiques dudit organisme ou développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules, lesdites protéines étant produites dans un système acellulaire à partir des acides nucléiques de l'échantillon.

2. Méthode de diagnostic de la présence d'un organisme ou du développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules dans un échantillon biologique selon la revendication 1, **caractérisée en ce qu'elle** comprend les étapes suivantes :

a) la préparation, à partir des acides nucléiques de l'échantillon, de molécules d'acides nucléiques comprenant le ou les gènes codant pour une ou plusieurs protéines spécifiques dudit organisme ou développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules et les éléments de contrôle nécessaires à la transcription et à la traduction du ou desdits gènes,

b) la transcription et la traduction dans un système acellulaire des molécules d'acide nucléique préparée(s) à l'étape (a),

c) le diagnostic de la présence d'un organisme ou du développement d'une maladie ou d'une infection ou encore de cellules par détection et/ou mesure de la fonction de la ou des protéines produites à l'étape (b).

3. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications précédentes **caractérisée en ce que** l'échantillon est un échantillon biologique brut.

4. Méthode de diagnostic selon la revendication 3 **caractérisée en ce que** l'échantillon est prélevé à partir de sang, de tissus, d'urine, ou de tout autre liquide corporel.

5. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisée en ce que** ladite fonction correspond à une activité enzymatique.

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

6. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisée en ce qu'**après la détection et/ou la mesure de la fonction de la ou des protéines spécifiques, on séquence la ou les molécules d'acide nucléique codant pour la ou les protéines spécifiques dont la fonction a été détectée et/ou mesurée.
- 5 7. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 6, **caractérisée en ce que** la détection et/ou la mesure de la fonction de la ou des protéines spécifiques est réalisée par tout test fonctionnel de la ou desdites protéines.
8. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, **caractérisée en ce que** la détection et/ou la mesure de la fonction de la ou des protéines spécifiques est réalisée à l'aide d'une ou plusieurs molécules rapporteur présente(s) à au moins une des étapes (a), (b) ou (c).
- 10 9. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisée en ce que** ladite fonction correspond à un ensemble de protéines spécifiques dont les gènes sont situés sur le même fragment d'ADN comme dans le cas d'un opéron, ou à différents endroits de l'ADN génomique.
- 15 10. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, **caractérisée en ce que** ladite fonction correspond à un ensemble de protéines spécifiques dont les gènes sont regroupés sous la forme d'un opéron, et **en ce que** l'étape (a) consiste à préparer à partir de l'échantillon d'acides nucléiques, une molécule d'acide nucléique comprenant les gènes de l'opéron codant pour les protéines correspondant à ladite fonction, si ils sont présents dans les acides nucléiques de l'échantillon, en 5' de l'ensemble desdits gènes de l'opéron, un promoteur d'ARN polymérase, éventuellement en 3' de l'ensemble desdits gènes de l'opéron un terminateur d'ARN polymérase, et pour chacun desdits gènes son site de fixation des ribosomes naturel.
- 20 11. Méthode de diagnostic selon la revendication 10, **caractérisée en ce que** le site de fixation des ribosomes de chacun des gènes est le site de fixation des ribosomes naturel, et **en ce qu'**à l'étape (b) on utilise un extrait de traduction préparé à partir d'une source identique ou proche de celle dont provient l'échantillon d'acides nucléiques.
- 25 12. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, **caractérisée en ce que** ladite fonction correspond à un ensemble de protéines spécifiques dont les gènes sont situés à différents endroits de l'ADN génomique, et **en ce que** l'étape (a) consiste à préparer, à partir de l'échantillon d'acide nucléique, une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant les gènes codant pour les protéines correspondant à ladite fonction, si ils sont présents dans les acides nucléiques de l'échantillon, en 5' de chacun desdits gène un promoteur d'ARN polymérase et un site de fixation des ribosomes, et éventuellement en 3' de chacun desdits gènes un terminateur d'ARN polymérase.
- 30 13. Méthode de diagnostic selon la revendication 12, **caractérisée en ce que** le site de fixation des ribosomes est le site naturel de chacun des gènes ou un autre site de fixation des ribosomes plus adapté à l'étape (b) de traduction.
- 35 14. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, **caractérisée en ce qu'**elle comprend :
- 40 i) la mesure de la fonction d'une ou plusieurs protéines spécifiques dudit organisme ou développement, comme défini dans l'une quelconque desdites revendications 1 à 13, puis
ii) la comparaison de ladite mesure de la fonction éventuellement présente dans l'échantillon avec une valeur étalon ou un ensemble de valeurs étalons de ladite fonction mesuré sur un ou plusieurs échantillons étalons
- 45 selon une méthode de mesure identique ou équivalente à celle de l'étape (i).
15. Méthode de diagnostic selon la revendication 14, **caractérisée en ce que** ledit échantillon étalon est tout échantillon contenant :
- 50 - une quantité, avantageusement connue, du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction, et qui sera alors soumis à un traitement de transcription traduction comme à l'étape (b), puis la fonction de la ou des protéines obtenue(s) sera mesurée selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c),
- 55 - une quantité, avantageusement connue, de la ou des protéines correspondant à ladite fonction, laquelle sera mesurée selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c),
- une quantité, avantageusement connue, d'un ou plusieurs organismes ou processus possédant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction, laquelle sera mesurée selon un procédé de mesure identique ou équivalent à celui de l'étape (c).

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

16. Méthode de quantification d'une fonction connue selon l'une des revendications 14 ou 15, **caractérisée en ce que** ledit échantillon étalon provient d'un milieu identique ou différent de celui sur lequel l'étape (i) est réalisée, et dans le cas d'un milieu identique prélevé à un moment différent.
- 5 17. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 14 à 16, **caractérisée en ce que** l'échantillon sur lequel l'étape (i) est réalisée contient l'échantillon étalon.
18. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 17, **caractérisée en ce qu'à** l'étape (a), les séquences de contrôle du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction sont, pour la transcription :
- 10
- un promoteur d'ARN polymérase en 5' du brin codant du ou desdits gènes,
 - éventuellement un terminateur d'ARN polymérase en 3',
- 15 et pour la traduction :
- un site de fixation des ribosomes qui peut être ou non le(s) site(s) de fixation naturel(s) du ou des gènes.
19. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 18, **caractérisée en ce qu'à** l'étape (a), on prépare la ou les molécules d'acide nucléique par une réaction d'amplification du ou des gènes codant pour la ou les protéines correspondant à ladite fonction.
- 20 20. Méthode selon la revendication 19, **caractérisée en ce que** la réaction d'amplification est du type PCR ou NASBA réalisée à l'aide d'une ou plusieurs paires d'amorces, chacune constituée :
- 25
- pour l'amorce sens, de la séquence s'hybridant en amont d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée, et d'un promoteur d'ARN polymérase et éventuellement un site de fixation des ribosomes, et
 - pour l'amorce antisens, de la séquence s'hybridant en aval d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique comprenant le ou les gènes codant pour la ou les protéines correspondant à la fonction analysée, et éventuellement d'un terminateur d'ARN polymérase.
- 30
21. Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 à 20, **caractérisée en ce que** l'on détecte et/ou mesure au moins deux fonctions, et **en ce qu'à** l'étape (a) on prépare les molécules d'acide nucléique codant pour la ou les protéines correspondant à chacune desdites fonctions, avec des amorces discriminantes ou non.
- 35
22. Méthode de diagnostic selon la revendication 21, **caractérisé en ce qu'à** l'étape (a) on utilise des amorces non discriminantes et **en ce qu'à** l'étape (c) on détecte et/ou l'on mesure lesdites fonctions par des tests fonctionnels permettant de différencier lesdites fonctions.
- 40
23. Méthode de diagnostic selon la revendication 21, **caractérisé en ce qu'à** l'étape (a) on utilise des amorces discriminantes et alors **en ce qu'à** l'étape (c) on détecte et/ou l'on mesure lesdites fonctions par des tests fonctionnels permettant ou non de différencier lesdites fonctions.
- 45
24. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 23, **caractérisé en ce qu'**après l'étape de transcription, on réalise une étape d'amplification du transcrit.
25. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 2 à 24, **caractérisée en ce qu'**après l'étape (c), on teste l'effet d'une substance, qui n'était pas présente dans l'échantillon, par la modification de la fonction.
- 50
26. Utilisation de la méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendication 1 à 25 pour le suivi de l'organisme, de la maladie ou de l'infection ou encore des cellules, notamment aux fins de traitement

55 Patentansprüche

1. Methode zur Diagnose der Anwesenheit eines Organismus oder der Entwicklung einer Krankheit oder einer Infektion oder aber von Zellen in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Funktion eines

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

oder mehrerer spezifischer Proteine des besagten Organismus oder der Entwicklung einer Krankheit oder einer Infektion oder aber von Zellen detektiert und/oder misst, wobei besagte Proteine in einem azellulären System ausgehend von Nukleinsäuren der Probe produziert wurden.

- 5 **2.** Methode zur Diagnose der Anwesenheit eines Organismus oder der Entwicklung einer Krankheit oder einer Infektion oder aber von Zellen in einer biologischen Probe nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie folgende Etappen beinhaltet:
- 10 a) die Herstellung von Nukleinsäuremolekülen ausgehend von Nukleinsäuren der Probe, welche das oder die codierenden Gene für ein oder mehrere spezifische Proteine des besagten Organismus oder der Entwicklung einer Krankheit oder einer Infektion oder aber von Zellen beinhaltet und die notwendigen Kontrollelemente für die Transkription und die Translation des besagten oder der besagten Gene,
- b) die Transkription und die Translation der in Etappe (a) hergestellten Nukleinsäuremoleküle in einem azellulären System,
- 15 c) die Diagnose der Anwesenheit eines Organismus oder der Entwicklung einer Krankheit oder einer Infektion oder aber von Zellen durch Detektion und/oder Messung der Funktion des oder der, in Etappe (b) hergestellten, Proteine.
- 20 **3.** Methode zur Diagnose nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probe eine biologische, unbearbeitete Probe ist.
- 4.** Methode zur Diagnose nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probe ausgehend von Blut, Zellgewebe, Urin oder anderen Körperflüssigkeiten gewonnen ist.
- 25 **5.** Methode zur Diagnose nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Funktion einer enzymatischen Aktivität entspricht.
- 6.** Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** man nach der Detektion und/oder der Messung der Funktion des oder der spezifischen Proteine das oder die codierenden Nukleinsäuremoleküle für das oder die spezifischen Proteine, dessen Funktion detektiert und/oder gemessen wurde, sequenziert.
- 30 **7.** Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Detektion und/oder die Messung der Funktion des oder der spezifischen Proteine durch alle zweckmäßigen Tests des oder der besagten Proteine durchgeführt wird.
- 35 **8.** Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Detektion und/oder die Messung der Funktion des oder der spezifischen Proteine mit Hilfe eines oder mehrerer Kontrollmoleküle, anwesend in mindestens einer der Etappen (a), (b) oder (c), realisiert wird.
- 40 **9.** Methode zur Diagnose nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Funktion einer Zusammensetzung von spezifischen Proteinen entspricht, dessen Gene sich auf dem selben Fragment der DNS, wie im Falle eines Operons, oder an unterschiedlichen Stellen der Genom-DNS befinden.
- 45 **10.** Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Funktion einer Zusammensetzung von spezifischen Proteinen entspricht, dessen Gene in der Form eines Operons zusammengefasst sind und wobei Etappe (a) die Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls ausgehend von einer Probe von Nukleinsäuren, welche die Gene des codierenden Operons für die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, falls diese in der Probe der Nukleinsäuren enthalten sind, an 5' der Zusammensetzung der besagten
- 50 Gene des Operons einen Promotor der RNS-Polymerase, eventuell an 3' der Zusammensetzung der besagten Gene des Operons einen Terminator der RNS-Polymerase und für jedes der besagten Gene seine Stelle der Fixierung der natürlichen Ribosomen beinhaltet.
- 55 **11.** Methode zur Diagnose nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stelle der Fixierung der Ribosomen jeden Gens die Stelle der Fixierung der natürlichen Ribosomen ist und wobei man in Etappe (b) einen Auszug der Translation benutzt, welcher aus einer Quelle hergestellt wurde, welche identisch oder ähnlich derjenigen ist, von welcher die Probe der Nukleinsäuren abstammt.

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

- 5
12. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Funktion einer Zusammensetzung von spezifischer Proteine entspricht, dessen Gene sich an unterschiedlichen Stellen der Genom-DNS befinden und wobei Etappe (a) die Herstellung eines oder mehrere Nukleinsäuremoleküle ausgehend von einer Probe von Nukleinsäuren, welche die codierenden Gene für die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, falls diese in der Probe der Nukleinsäuren enthalten sind, an 5' jedes besagten Gens einen Promotor der RNS-Polymerase und eine Stelle der Fixierung der Ribosomen, und eventuell an 3' jedes besagten Gens einen Terminator der RNS-Polymerase beinhaltet.
- 10
13. Methode zur Diagnose nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stelle der Fixierung der Ribosomen die natürliche Stelle jedes Gens ist oder eine andere Stelle der Fixierung der Ribosomen, welche besser an Etappe (b) der Translation angepasst ist.
- 15
14. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie beinhaltet:
i) die Messung der Funktion eines oder mehrerer spezifischer Proteine besagten Organismus oder besagter Entwicklung, wie in einem der beschriebenen Ansprüche 1 bis 13 definiert, weiterhin
ii) der Vergleich der besagten Messung der Funktion eventuell anwesend in der Probe mit einem Eichwert oder einer Zusammensetzung von Eichwerten der besagten Funktion, gemessen an einem oder an mehreren Eichproben nach einer, der in Etappe (i) beschriebenen, identischen oder äquivalenten Messmethode.
- 20
15. Methode zur Diagnose nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Eichprobe alle Proben sind, welche beinhalten:
- eine Menge, vorteilhafterweise bekannt, des oder der codierenden Gene für das oder die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, und welche dann einer Behandlung von Transkription - Translation, wie in Etappe (b) beschrieben, unterworfen wird, anschließend wird die Funktion des oder der erhaltenen Proteine nach einem, der in Etappe (c) beschriebenen, identischen oder äquivalenten Messverfahren gemessen,
- eine Menge, vorteilhafterweise bekannt, des oder der Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, und welche nach einem, der in Etappe (c) beschriebenen, identischen oder äquivalenten Messverfahren gemessen wird,
- eine Menge, vorteilhafterweise bekannt, eines oder mehrerer Organismen oder Prozesse, welche ein oder mehrere codierende Gene für das oder die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, enthalten, und welche nach einem, der in Etappe (c) beschriebenen, identischen oder äquivalenten Messverfahren gemessen wird.
- 25
30
35
16. Methode zur Quantifizierung einer Funktion bekannt nach einem der Ansprüche 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** die besagte Eichprobe aus einem identischen oder unterschiedlichen Milieu stammt, auf welches Etappe (i) angewendet wird und im Falle, dass das Milieu identisch ist, an einem anderen Zeitpunkt entnommen wird.
- 40
17. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 14 bis 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probe, auf welche Etappe (i) angewendet wird, die Eichprobe enthält.
- 45
18. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Etappe (a) die Kontrollsequenzen des oder der codierenden Gene für das oder die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, für die Transkription sind:
- ein Promotor der RNS-Polymerase an 5' des Strangs, welcher das oder die besagten Gene codiert,
- eventuell ein Terminator der RNS-Polymerase an 3', und für die Translation:
- eine Stelle der Fixierung der Ribosomen, welche der natürlichen Stelle(n) der Fixierung des oder der Gene entsprechen oder nicht entsprechen kann.
- 50
55
19. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in Etappe (a) das oder die Nukleinsäuremoleküle durch eine Vervielfältigungsreaktion des oder der codierenden Gene für das oder die Proteine, welche der besagten Funktion entsprechen, herstellt.
20. Methode nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Vervielfältigungsreaktion vom Typ PCR oder NASBA realisiert mit Hilfe eines oder mehrerer Primerpaare ist, welche jeweils bestehen aus:

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

- für die sens-Primer, der Sequenz, welche sich oberhalb des oder der Nukleinsäuremoleküle, welche das oder die codierenden Gene für das oder die Proteine, welche der analysierten Funktion entsprechen, beinhaltet, hybridisiert und einem Promotor der RNS-Polymerase und eventuell einer Stelle der Fixierung der Ribosomen, und
 - für die antisens-Primer, der Sequenz, welche sich unterhalb des oder der Nukleinsäuremoleküle, welche das oder die codierenden Gene für das oder die Proteine, welche der analysierten Funktion entsprechen, beinhaltet, hybridisiert und eventuell einem Terminator der RNS-Polymerase.
21. Methode nach einem der Ansprüche 2 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** man mindestens zwei Funktionen detektiert und/oder misst, und dass man in der Etappe (a) die codierenden Nukleinsäuremoleküle für das oder die Proteine, welche jeder der besagten Funktionen entsprechen, mit einem diskriminierenden oder nichtdiskriminierenden Primer herstellt.
22. Methode zur Diagnose nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in der Etappe (a) einen nichtdiskriminierenden Primer benutzt und man in der Etappe (c) die besagten Funktionen mit zweckmäßigen Tests, welche die Differenzierung der besagten Funktionen ermöglichen, detektiert und/oder misst.
23. Methode zur Diagnose nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in der Etappe (a) einen diskriminierenden Primer benutzt und man also in der Etappe (c) die besagten Funktionen mit zweckmäßigen Tests, welche die Differenzierung der besagten Funktionen ermöglichen oder nicht ermöglichen, detektiert und/oder misst.
24. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 23, **dadurch gekennzeichnet, dass** man nach der Etappe der Transkription eine Etappe der Vervielfältigung des Transkripts durchführt.
25. Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 2 bis 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** man nach der Etappe (c) den Effekt einer Substanz, welche nicht in der Probe enthalten war, durch die Veränderung der Funktion testet.
26. Anwendung der Methode zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1 bis 25 für die Überwachung des Organismus, der Krankheit oder der Infektion oder aber der Zellen vor allem am Ende der Behandlung.

Claims

1. A method for diagnosing the presence of an organism or of the development of a disease or an infection or even of cells, in a biological sample, **characterized in that** the function of one or more specific proteins of said organism or development of a disease or an infection or even of cells, is detected and/or measured, said proteins being produced in an acellular system from the nucleic acids of the sample.
2. The method for diagnosing the presence of an organism or of the development of a disease or an infection or even of cells, in a biological sample according to claim 1, **characterized in that** it comprises the following steps:
- a) preparation, from the nucleic acids of the sample, of nucleic acid molecules comprising the gene(s) coding for one or more specific proteins of said organism or development of the disease or an infection or even of cells, and the control elements required for transcription and translation of said gene(s),
 - b) transcription and translation in an acellular system of the nucleic acid molecule(s) prepared in step (a),
 - c) diagnose of the presence of an organism or of the development of a disease or an infection or even of cells by detecting and/or measuring the function of the protein(s) produced in step (b).
3. The diagnose method according to any of the preceding claims, **characterized in that** the sample is a raw biological sample.
4. The diagnose method according to claim 3, **characterized in that** the sample is taken from blood, from tissues, from urine, or from any other body liquid.
5. The diagnose method according to any of the preceding claims, **characterized in that** said function corresponds to an enzymatic activity.

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

6. The diagnose method according to any of claims 1 to 5, **characterized in that**, after detecting and/or measuring the function of the specific protein(s), the molecule(s) of nucleic acid coding for the specific protein(s) are sequenced, the function of which has been detected and/or measured.
- 5 7. The diagnose method according to any of claims 1 to 6, **characterized in that** the detection and/or the measurement of the function of the specific protein(s) is performed by any functional test of said protein(s).
8. The diagnose method according to any of claims 2 to 7, **characterized in that** the detection and/or the measurement of the function of the specific protein(s) is performed by means of one or more reporter molecule(s) present in at least one of the steps (a), (b), or (c).
- 10
9. The diagnose method according to any of the preceding claims, **characterized in that** said function corresponds to a set of specific proteins, the genes of which are located on the same DNA fragment as in the case of an operon, or in different locations of the genomic DNA.
- 15
10. The diagnose method according to any of claims 2 to 9, **characterized in that** said function corresponds to a set of specific proteins, the genes of which are grouped together as an operon, and **in that** step (a) consists of preparing from the sample of nucleic acids, a nucleic acid molecule comprising the genes of the operon coding for the protein corresponding to said function, if they are present in the nucleic acids of the sample, in 5' of the set of said genes of the operon, a RNA polymerase promoter, possibly in 3' of the set of said genes of the operon, a RNA polymerase terminator, and for each of said genes its natural site for fixing ribosomes.
- 20
11. The diagnose method according to claim 10, **characterized in that** the site for fixing ribosomes of each of the genes is the natural site for fixing ribosomes and **in that** in step (b), a translation extract prepared from an identical source, or close to the one from which the sample of nucleic acids is derived, is used.
- 25
12. The diagnose method according to any of claims 2 to 9, **characterized in that** said function corresponds to a set of specific proteins, the genes of which are located in different locations of the genomic DNA, and **in that** step (a) consists of preparing from the nucleic acid sample, one or more nucleic acid molecules comprising the genes coding for the proteins corresponding to said function, if they are present in the nucleic acids of the sample, in 5' of each of said genes a RNA polymerase promoter and a site for fixing ribosomes and possibly in 3' of each of said genes a RNA polymerase terminator.
- 30
13. The diagnose method according to claim 12, **characterized in that** the site for fixing ribosomes is the natural site for each of the genes or another site for fixing ribosomes more suitable for the translation step (b).
- 35
14. The diagnose method according to any of claims 1 to 13, **characterized in that** it comprises:
- 40
- i) the measurement of the function of one or more specific proteins of said organism or development, as defined in any of said claims 1 to 13, and then
 - ii) the comparison of said measurement of the function possibly present in the sample with a standard value or a set of standard values of said function measured over one or more standard samples according to a measurement method identical with or equivalent to the one of step (i).
- 45
15. The diagnose method according to claim 14, **characterized in that** said standard sample is any sample containing:
- a quantity, advantageously known, of the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to said function, and which will then undergo transcription/translation processing as in step (b), and then the function of the protein (s) obtained will be measured according to a measurement method identical with or equivalent to the one of step (c).
- 50
- a quantity, advantageously known, of the protein(s) corresponding to said function, which will be measured according to a measurement method identical or equivalent to the one of step (c),
 - a quantity, advantageously known, of one or more organisms or processes having the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to said function, which will be measured according to a measurement method identical with or equivalent to the one of step (c).
- 55
16. The method for quantitating a known function according to any of claims 14 or 15, **characterized in that** said standard sample comes from a medium identical with or different from the one on which step (i) is performed and

EP 1 137 801 B9 (W1B1)

in the case of an identical medium is taken at a different time.

5 17. The diagnose method according to any of claims 14 to 16, **characterized in that** the sample on which step (i) is performed, contains the standard sample.

18. The diagnose method according to any of claims 2 to 17, **characterized in that** in step (a), the control sequences of the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to said function are, for transcription:

- 10
- a RNA polymerase promoter in 5' of the coding strand of said gene(s),
 - possibly a RNA polymerase terminator in 3',

and for translation:

- 15
- a site for fixing ribosomes which may or may not be the natural site(s) for fixing gene(s).

19. The diagnose method according to any of claims 2 to 18, **characterized in that** in step (a), the nucleic acid molecule (s) is(are) prepared by an amplification reaction of the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to said function.

20 20. The method according to claim 19, **characterized in that** the amplification reaction is of the PCR or NASBA type, performed by means of one or more primer pairs, each consisting:

- 25
- for the sense primer, of the sequence hybridizing upstream from one or more nucleic acid molecules comprising the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to the analyzed function and of a RNA polymerase promoter and possibly a site for fixing ribosomes, and
 - for the antisense primer, of the sequence hybridizing downstream from one or more nucleic acid molecules comprising the gene(s) coding for the protein(s) corresponding to the analyzed function, and possibly of a RNA polymerase terminator.

30 21. The method according to any of claims 2 to 20, **characterized in that** at least two functions are detected and/or measured, and **in that** in step (a), nucleic acid molecule(s) coding for the protein(s) corresponding to each of said functions are prepared with discriminating or non-discriminating primers.

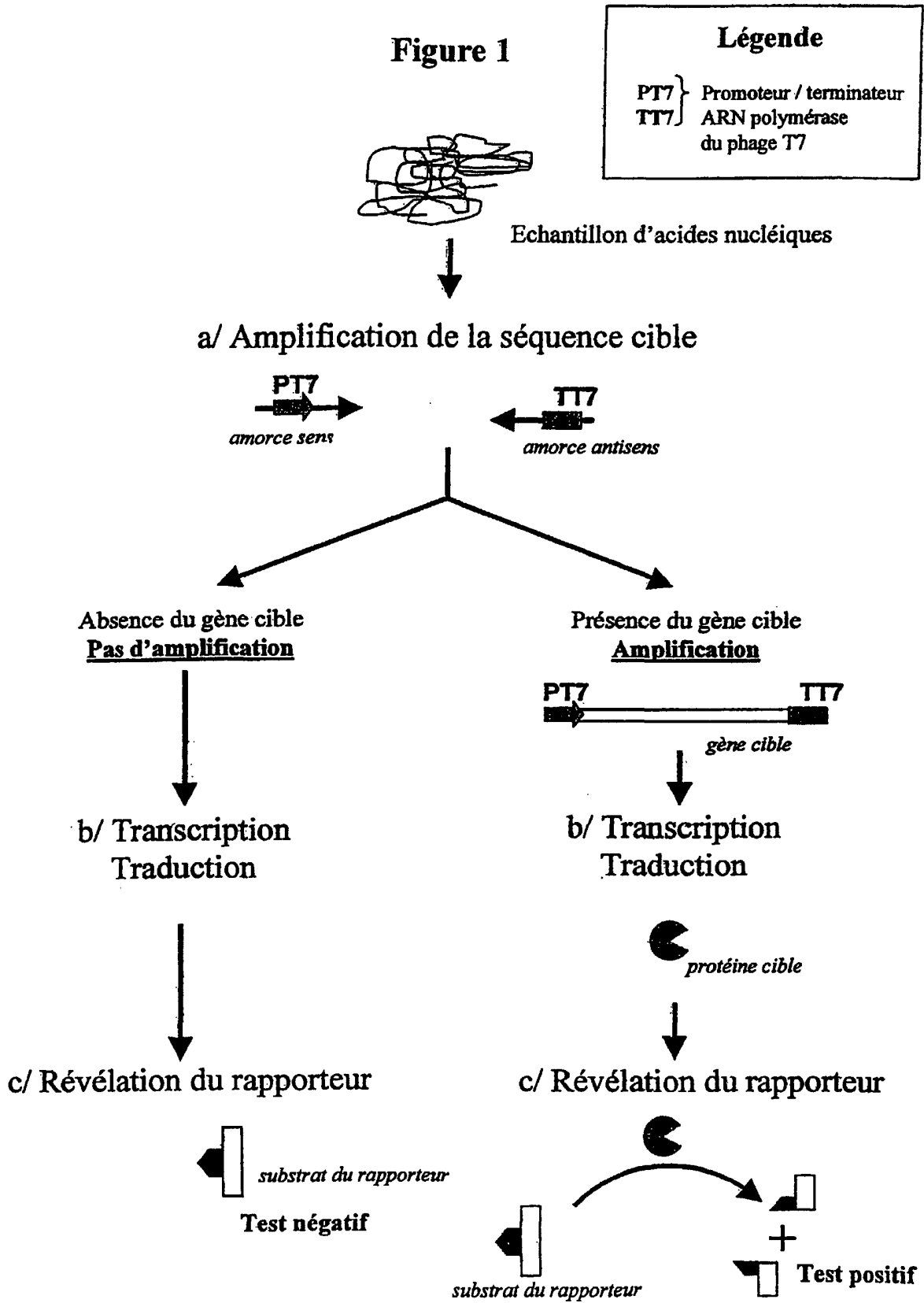
35 22. The diagnose method according to claim 21, **characterized in that** in step (a), non-discriminating primers are used, and **in that** in step (c), said functions are detected and/or measured by functional tests enabling said functions to be differentiated.

40 23. The diagnose method according to claim 21, **characterized in that** in step (a), discriminating primers are used and then **in that** in step (c), said functions are detected and/or measured by functional tests enabling said functions to be differentiated or not.

24. The diagnose method according to any of claims 2 to 23, **characterized in that** after the transcription step, a transcript amplification step is performed.

45 25. The diagnose method according to any of claims 2 to 24, **characterized in that** after step (c), the effect of a substance which was not present in the sample, is tested by changing the function.

50 26. The use of the diagnose method according of claims 1 to 25 for the follow-up of the organism, of the disease or of the infection, or even of the cells, notably for the purposes of treating them.



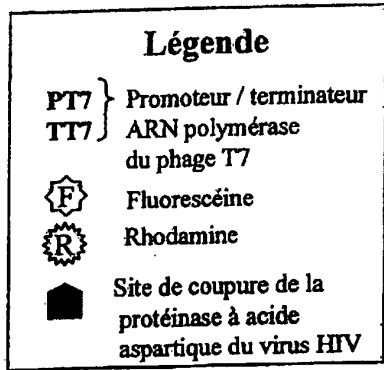
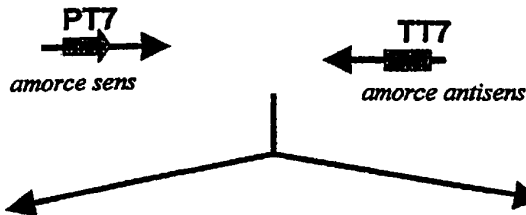


Figure 2



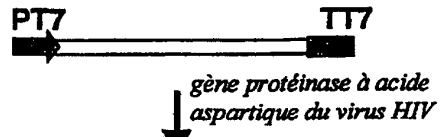
Echantillon d'acides nucléiques

a/ Amplification de la séquence cible



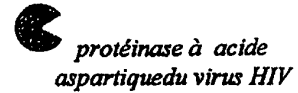
Absence du gène cible
Pas d'amplification

Présence du gène cible
Amplification



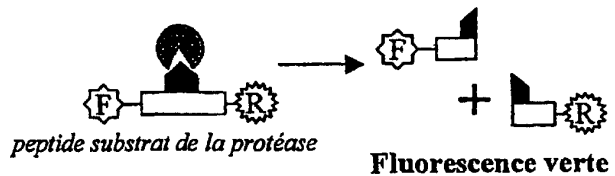
**b/ Transcription
Traduction**

**b/ Transcription
Traduction**



c/ Révélation du rapporteur

c/ Révélation du rapporteur



Caractérisation de la protéinase à acide aspartique (résistance aux anti-protéases)

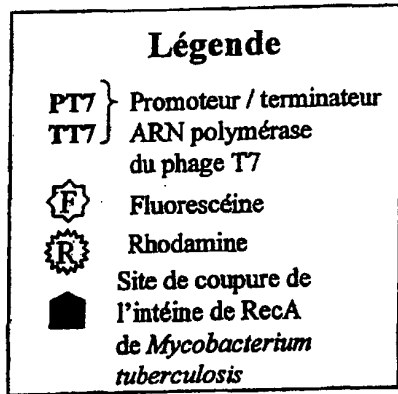


Figure 3



Echantillon d'acides nucléiques

a/ Amplification de la séquence cible



Absence du gène cible
Pas d'amplification

Présence du gène cible
Amplification



gène intéine de RecA de *Mycobacterium tuberculosis*

**b/ Transcription
Traduction**

**b/ Transcription
Traduction**

intéine de RecA de *Mycobacterium tuberculosis*

c/ Révélation du rapporteur

c/ Révélation du rapporteur



Fluorescence rouge



Fluorescence verte

Caractérisation de l'intéine de RecA de *Mycobacterium tuberculosis*

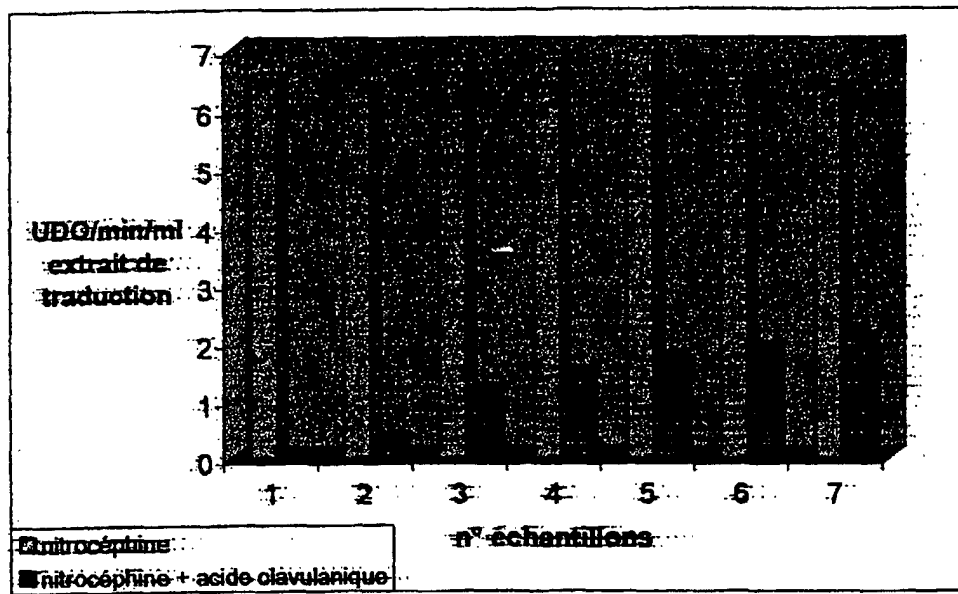


Figure 4: Détection de l'activité totale ou de l'activité des germes polyrésistants

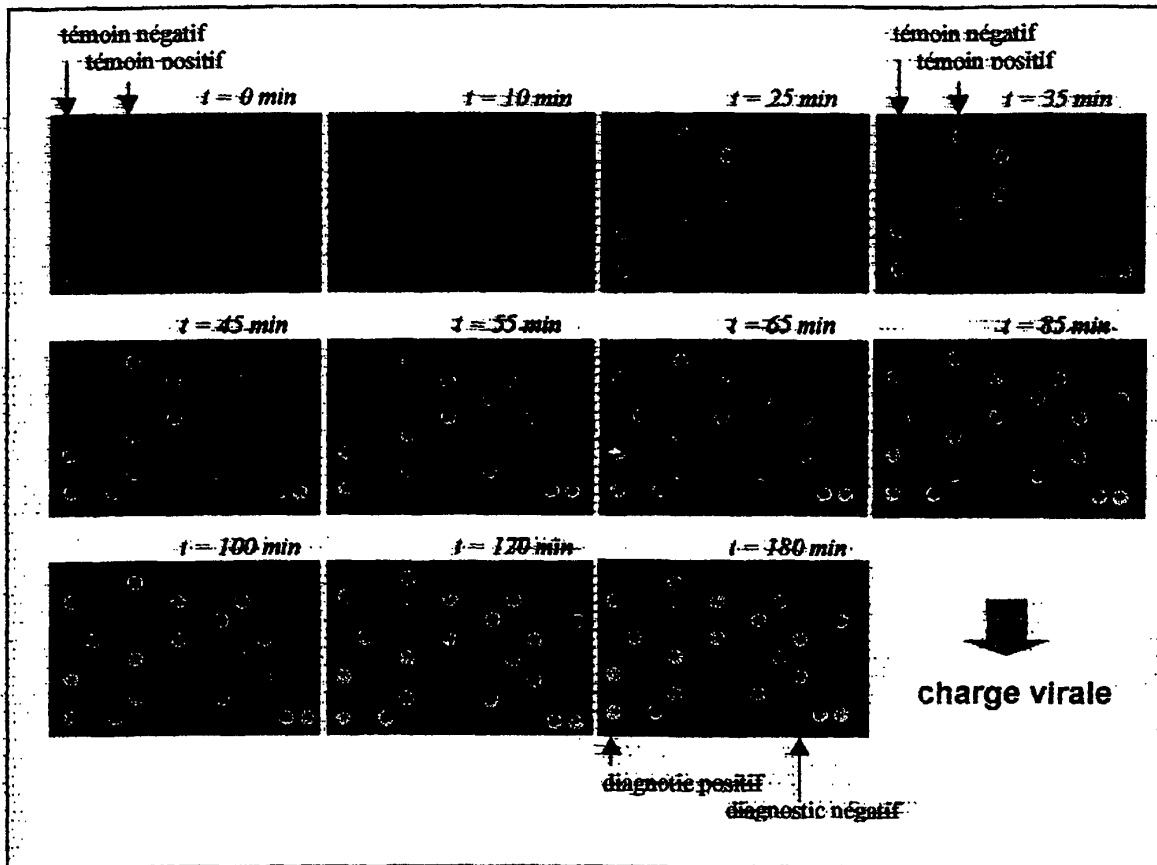


Figure 5: Détection et quantification de la charge virale

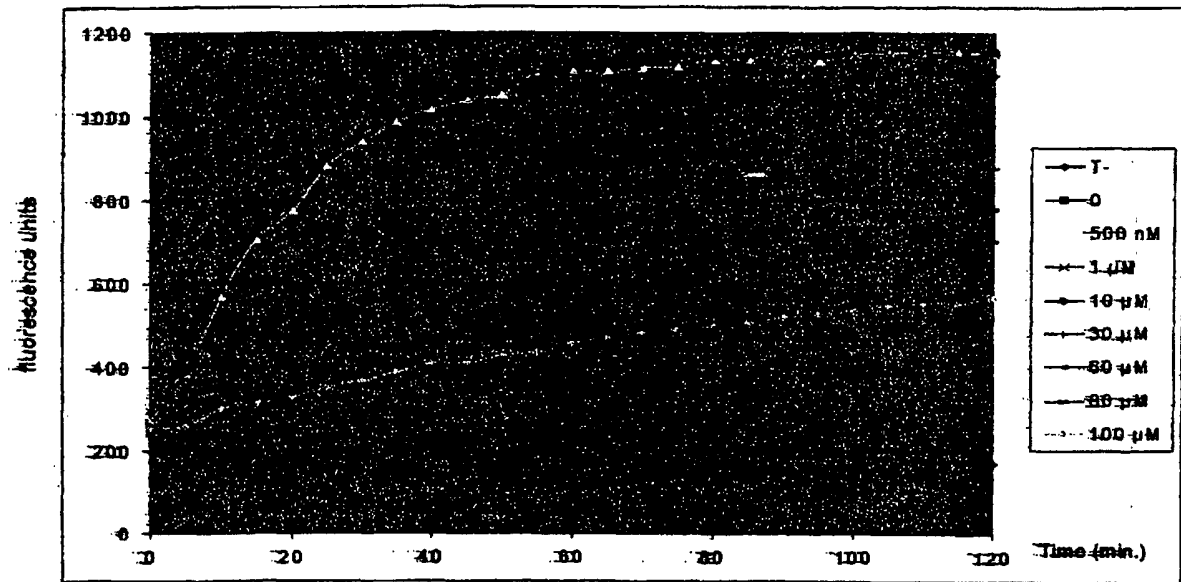


Figure 6 : Caractérisation de l'effet d'un inhibiteur sur un échantillon positif
Témoin : échantillon négatif