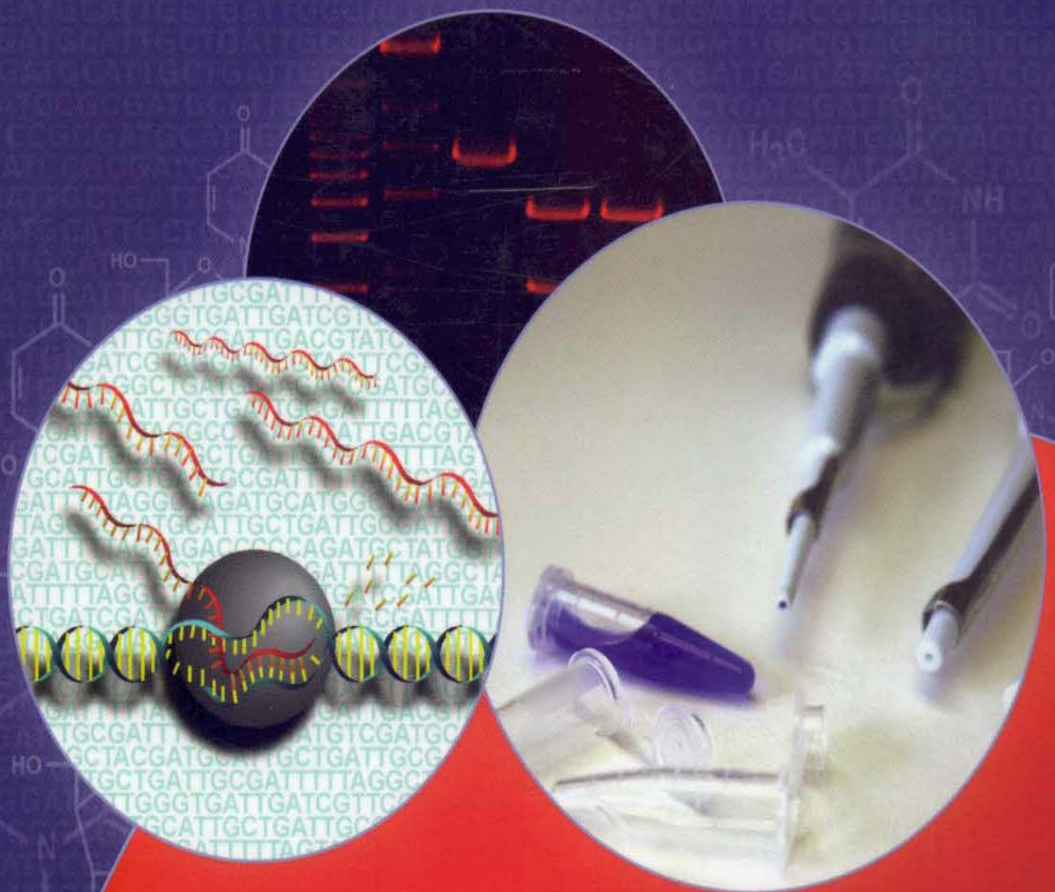


Biologie moléculaire

Concepts · Techniques · Applications



Joëlle Brodeur · Martin Toussaint



TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
Chapitre 1 – ADN et ARN	3
1.1 Fonction des acides nucléiques	3
1.2 Structure d'un nucléotide et d'un polynucléotide	4
1.3 Complémentarité des brins de l'ADN et double hélice	6
1.4 Polarité d'un brin d'ADN	8
1.5 Histones, chromatine et chromosomes	8
1.6 Différences entre eucaryotes et procaryotes	9
1.7 Cycle de vie d'une cellule	10
1.7.1 Cycle cellulaire	10
1.7.2 Division cellulaire : mitose	11
1.7.3 Division cellulaire : méiose	12
1.8 Résumé	13
1.9 Exercices	15
Chapitre 2 – De l'ADN aux protéines	17
2.1 Réplication	17
2.1.1 Définition	17
2.1.2 Initiation	18
2.1.3 Réplication semi-conservative	18
2.1.4 Polarité de réplication	19
2.1.5 Mécanisme	20
2.2 Transcription	20
2.2.1 Définition	20
2.2.2 Initiation	21
2.2.3 Élongation du transcrit d'ARN messenger	22
2.2.4 Terminaison	22
2.2.5 Maturation de l'ARNm	22
2.3 Traduction	23
2.3.1 Définition	23

2.3.2	Code génétique	23
2.3.3	Initiation	24
2.3.4	Élongation	24
2.3.5	Terminaison	25
2.4	Structure des protéines	26
2.5	Résumé	26
2.6	Exercices	28

Chapitre 3 – Enzymes de modification de l'ADN 29

3.1	Enzymes de restriction	29
3.1.1	Origine	29
3.1.2	Utilité	30
3.1.3	Mode de fonctionnement	30
3.1.4	Sites de reconnaissance	30
3.2	Digestion de l'ADN	31
3.2.1	Digestion partielle et activité étoile	32
3.3	Autres enzymes de modification de l'ADN	33
3.3.1	Remplissage ou digestion des extrémités saillantes	33
3.3.2	Ligation de fragments d'ADN	34
3.3.3	Phosphorylation de l'ADN	34
3.3.4	Déphosphorylation de l'ADN	35
3.3.5	Tampons de réaction	35
3.4	Résumé	36
3.5	Exercices	36

Chapitre 4 – Mutations et transmission des caractères génétiques 37

4.1	Définition	37
4.2	Terminologie	38
4.2.1	Génotype et phénotype	38
4.2.2	Haploïdie et diploïdie	38
4.2.3	Dominance et récessivité	38
4.2.4	Mutant et type sauvage	39
4.3	Types de mutations	40
4.4	Mutations chez les humains	42
4.4.1	Mutations récessives liées au chromosome X	42
4.4.2	Mutations dominantes liées au chromosome X	42
4.4.3	Mutations autosomiques récessives	42
4.4.4	Mutations autosomiques dominantes	43
4.5	Polymorphisme	44
4.5.1	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP)	44
4.5.2	Nombre variable de répétitions en tandem (VNTR)	44
4.5.3	Courtes répétitions en tandem (STR)	44
4.5.4	Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)	45
4.6	Résumé	46
4.7	Exercices	46

Chapitre 5 – Clonage moléculaire 47

5.1	Définition	47
-----	------------	----

5.2	Plasmides	49
5.3	Vecteurs de clonage	49
5.3.1	Composantes de base	50
5.3.1.1	Origine de réplication (ori)	50
5.3.1.2	Gène de sélection	51
5.3.1.3	Site de clonage multiple	51
5.3.2	Composantes facultatives	51
5.3.2.1	Marqueur de criblage	52
5.3.2.2	Promoteur et terminateur de transcription	52
5.3.2.3	Marqueur nutritionnel et origine de réplication supplémentaire	54
5.3.2.4	Épitopes	55
5.3.2.5	Séquences bordant le site de clonage multiple	55
5.4	Résumé	56
5.5	Exercices	56

Chapitre 6 – Techniques d'analyse de l'ADN 57

6.1	Analyse sur gel d'agarose	58
6.1.1	Préparation et chargement d'un gel d'agarose	58
6.1.2	Migration de l'ADN	59
6.1.2.1	Migration de l'ADN selon sa conformation tridimensionnelle	59
6.1.2.2	Migration de l'ADN selon la taille des molécules	60
6.1.2.3	Migration de l'ADN selon la charge des molécules	62
6.1.3	Visualisation de l'ADN dans un gel d'agarose	62
6.2	Analyse de la concentration de l'ADN	64
6.2.1	Dosage de l'ADN à l'aide d'un gel d'agarose	64
6.2.2	Dosage de l'ADN par spectrophotométrie	64
6.2.3	Dosage de l'ADN à l'aide de colorants fluorescents	65
6.3	Analyse sur gel de polyacrylamide	66
6.4	Protocoles	68
6.4.1	Quelques notes sur la manipulation de l'ADN	68
6.4.2	Préparation d'un gel d'agarose	68
6.4.2.1	Préparation des solutions	69
6.4.2.2	Préparation du gel	70
6.4.2.3	Préparation des échantillons	71
6.4.2.4	Migration et visualisation de l'ADN	71
6.4.3	Préparation d'un gel de polyacrylamide (non dénaturant)	72
6.4.3.1	Préparation des solutions	72
6.4.3.2	Préparation du gel	73
6.4.3.3	Préparation des échantillons	74
6.4.3.4	Migration et visualisation de l'ADN	74
6.5	Résumé	75
6.6	Exercices	75

Chapitre 7 – Utilisation d'*Escherichia coli* en biologie moléculaire 77

7.1	Transformation d'une bactérie par un plasmide	78
7.1.1	Définition de la transformation	78
7.1.1.1	Transformation par la chaleur	79
7.1.1.2	Électroporation	79

7.1.2	Souches utilisées	80
7.2	Sélection ou criblage des transformants	82
7.3	Extraction d'ADN plasmidique	83
7.3.1	Mini-préparation	84
7.3.2	Midi-préparation et maxi-préparation	86
7.4	Production et purification de protéines recombinantes	86
7.4.1	Système d'induction	86
7.4.1.1	Principales étiquettes utilisées	86
7.5	Protocoles	88
7.5.1	Transformation par la chaleur	88
7.5.1.1	Préparation des solutions	89
7.5.1.2	Transformation	90
7.5.2	Mini-préparation d'ADN plasmidique	91
7.5.2.1	Préparation des solutions	92
7.5.2.2	Mini-préparation d'ADN plasmidique (« mini-prep »)	94
7.5.3	Purification d'une protéine à l'aide de son étiquette histidine	96
7.5.3.1	Préparation des solutions	97
7.5.3.2	Purification des protéines	98
	A. Culture bactérienne et induction de la protéine	98
	B. Préparation de l'extrait cellulaire	98
	C. Préparation de la colonne d'affinité	99
	D1. Purification de la protéine (cas d'une protéine soluble, surnageant A)	99
	D2. Purification de la protéine (cas d'une protéine insoluble, surnageant B)	100
7.6	Résumé	101
7.7	Exercices	101

Chapitre 8 – Étapes détaillées d'un clonage moléculaire 103

8.1	Cartes de restriction	103
8.2	Étapes d'un clonage moléculaire	106
8.2.1	Élaboration d'une stratégie de clonage	106
8.2.1.1	Choix du vecteur et de l'insert	106
8.2.1.2	Choix des sites de restriction	108
	A. Si possible, choisir des sites de restriction cohésifs entre eux	108
	B. Choisir des sites différents de chaque côté du vecteur et de l'insert	110
	C. Choix de site unique dans le vecteur	110
	D. Choix de site unique dans l'insert	110
	E. Choisir des enzymes de restriction couramment utilisées	111
	F. Vérifier la compatibilité de réaction entre les enzymes choisies	111
8.2.1.3	Déphosphorylation du vecteur	115
8.2.1.4	Autres points à planifier	115
8.2.2	Digestion du vecteur et de l'insert	115
8.2.3	Purification du vecteur et de l'insert sur gel	115
8.2.4	Déphosphorylation du vecteur	117
8.2.5	Changement de tampon de réaction	117
8.2.6	Ligation de l'insert avec le vecteur	119
8.2.7	Digestion post-ligation de produits non désirés	121
8.2.8	Témoins	121
8.2.9	Transformation de la bactérie avec le produit de ligation	122
8.2.10	Sélection ou criblage des transformants	122

8.2.11	Identification des clones contenant la construction recherchée	122
8.2.12	Entreposage des transformants intéressants	124
8.3	Protocoles	124
8.3.1	Précipitation de l'ADN	124
8.3.1.1	Préparation des solutions	125
8.3.1.2	Précipitation de l'ADN	125
8.3.2	Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose	127
8.3.2.1	Préparation des solutions	127
8.3.2.2	Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose	128
8.4	Résumé	129
8.5	Exercices	129

Chapitre 9 – Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR 133

9.1	Principe du PCR	133
9.1.1	Dénaturation de l'ADN	135
9.1.2	Hybridation des amorces	135
9.1.3	Polymérisation	135
9.1.4	Production d'un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN grâce à l'enchaînement de plusieurs cycles	136
9.2	Température de fusion (T_m) d'un fragment d'ADN	136
9.3	Constituants essentiels d'un mélange réactionnel de PCR	137
9.3.1	ADN matrice	137
9.3.2	Amorces complémentaires au fragment cible	138
9.3.3	Désoxynucléotides	139
9.3.4	Polymérase thermorésistante	139
9.3.5	Tampon de réaction	140
9.4	Utilités fréquentes d'un PCR	140
9.4.1	Ajout de séquences	140
9.4.2	Clonage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR dans un vecteur T	142
9.4.3	Introduction de mutations dans un fragment d'ADN	143
9.4.4	Amplification d'un ensemble de fragments d'ADN	144
9.5	Thermocycleur	145
9.6	PCR en temps réel	145
9.6.1	Méthodes de détection de l'ADN amplifié	147
9.6.1.1	Colorant <i>SYBR green</i>	147
9.6.1.2	Sondes d'hybridation	147
9.6.1.3	Sondes Taqman	148
9.6.1.4	Balises moléculaires	149
9.7	RT-PCR	151
9.8	Analyse d'une réaction de PCR	151
9.9	Précautions à prendre au moment de préparer une réaction de PCR	151
9.10	Protocole de PCR	152
9.10.1	Préparation des solutions	153
9.10.2	Préparation des bactéries	154
9.10.3	Programmation du thermocycleur	154
9.10.4	Préparation du mélange réactionnel	154
9.10.5	Analyse du produit de réaction	155
9.11	Résumé	155
9.12	Exercices	156

Chapitre 10 – Sondes nucléiques	157
10.1 Marquage des sondes avec des groupements radioactifs	158
10.1.1 Radioactivité	158
10.1.1.1 Utilisation d'isotopes radioactifs en biologie moléculaire	158
10.1.1.2 Radioprotection	159
10.1.1.3 Demi-vie des isotopes radioactifs	159
10.1.2 Marquage d'un fragment d'ADN	160
10.1.2.1 Marquage interne	160
A. Marquage aléatoire	160
B. Marquage d'un fragment d'ADN par PCR	160
10.1.2.3 Marquage aux extrémités	162
A. Marquage par incorporation de nucléotides marqués	162
B. Marquage en 5' par un phosphate radioactif	163
10.1.3 Marquage d'ARN	163
10.2 Autres méthodes de marquage	165
10.2.1 Chimiluminescence	165
10.3 Enlèvement des nucléotides libres	166
10.4 Protocoles	167
10.4.1 Marquage aléatoire d'un fragment d'ADN double brin	167
10.4.1.1 Préparation des solutions	168
10.4.1.2 Marquage de l'ADN	168
10.4.2 Marquage en 5' d'un phosphate radioactif par une réaction d'échange	169
10.4.2.1 Préparation des solutions	169
10.4.2.2 Marquage de l'ADN	169
10.5 Résumé	170
10.6 Exercices	170
Chapitre 11 – Séquençage de l'ADN	171
11.1 Principe	171
11.2 Automatisation	175
11.3 Séquençage du génome humain	176
11.4 Résumé	176
11.5 Exercices	177
Chapitre 12 – Extraction et analyse de l'ADN	179
12.1 Analyse in vitro de l'ADN	179
12.1.1 Extraction et purification de l'ADN	179
12.1.2 Buvardage à la Southern (<i>Southern blot</i>)	180
12.1.2.1 Digestion et migration de l'ADN	182
12.1.2.2 Transfert de l'ADN	182
A. Type de tampon de transfert	183
B. Type de transfert	183
12.1.2.3 Fixation de l'ADN sur la membrane	184
12.1.2.4 Hybridation	184
12.1.2.5 Lavages et exposition de la membrane	184
12.2 Analyse in vivo de l'ADN	185
12.2.1 Caryotypage	185
12.2.1.1 Anomalies chromosomiques	186

	A. Anomalies de nombre	186
	B. Anomalies de structure	187
12.2.2	Hybridation <i>in situ</i>	187
12.2.2.1	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence (FISH)	188
12.2.2.2	Hybridation génomique comparative (CGH)	189
12.2.2.3	Peinture chromosomique	190
12.2.2.4	Élongation d'amorce <i>in situ</i> (PRINS)	190
12.3	Protocoles	190
12.3.1	Extraction d'ADN à partir de prélèvements sanguins	190
12.3.1.1	Préparation des solutions	191
12.3.1.2	Extraction de l'ADN	192
12.3.2	Extraction d'ADN à partir de queues de souris	193
12.3.2.1	Préparation des solutions	193
12.3.2.2	Extraction de l'ADN	194
12.3.3	Buvardage à la Southern	194
12.3.3.1	Préparation des solutions	195
12.3.3.2	Digestion de l'ADN	197
12.3.3.3	Migration de l'ADN	199
12.3.3.4	Transfert	199
	A. Traitement du gel	199
	B. Préparation de la membrane et des papiers de transfert	200
	C. Préparation du montage de transfert	200
	D. Transfert	200
12.3.3.5	Hybridation	201
12.3.3.6	Lavages	202
12.3.3.7	Exposition	202
12.4	Résumé	203
12.5	Exercices	203

Chapitre 13 – Analyse de l'ARN 205

13.1	Enzymes qui dégradent l'ARN : les RNases	205
13.1.1	Sources de contamination par les RNases	206
13.2	Extraction de l'ARN	207
13.2.1	Extraction à l'isothiocyanate de guanidine	207
13.2.2	Purification de l'ARNm	207
13.2.3	Dosage de l'ARN	207
13.3	Analyse de l'ARNm	207
13.3.1	Buvardage à la northern	208
13.3.2	RT-PCR	208
13.3.3	Puces à ADN	209
13.3.3.1	Exemple d'application des puces à ADN	211
13.3.4	Analyse de la localisation de l'ARN par hybridation <i>in situ</i>	211
13.3.5	Autres méthodes d'analyse de l'ARN	211
13.4	Protocoles	211
13.4.1	Extraction de l'ARN	211
13.4.1.1	Préparation des solutions	212
13.4.1.2	Extraction de l'ARN	213
13.4.2	RT-PCR	214
13.4.2.1	Préparation des solutions	214

13.4.2.2	Transcription inverse	215
13.4.2.3	PCR	215
13.5	Résumé	215
13.6	Exercices	216
Chapitre 14 – Analyse des protéines		217
14.1	Extraction des protéines	217
14.2	Purification des protéines	218
14.2.1	Précipitation différentielle des protéines	218
14.2.2	Chromatographie sur colonne	219
14.2.3	Stabilité des protéines	220
14.3	Dosage des protéines	221
14.3.1	Méthode spectrophotométrique	221
14.3.2	Méthodes colorimétriques	222
14.4	Électrophorèse des protéines	222
14.4.1	Gels de polyacrylamide dénaturants (SDS-PAGE)	223
14.4.2	Gels de polyacrylamide natifs	225
14.4.3	Électrophorèse en deux dimensions	225
14.4.4	Coloration des protéines d'un gel	226
14.5	Buvardage à la western (<i>western blot</i>)	226
14.5.1	Types d'anticorps	227
14.6	Séquençage de protéines	228
14.7	Analyse des propriétés enzymatiques des protéines	228
14.8	Analyse des interactions protéine-protéine	229
14.8.1	Coimmunoprécipitation	229
14.8.2	Copurification en chromatographie	230
14.8.3	Double hybride	230
14.8.4	FRET	231
14.9	Interactions protéine — ADN	232
14.9.1	Retardement sur gel	232
14.9.2	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	232
14.10	Analyse de la localisation des protéines	234
14.10.1	Immunohistochimie et immunofluorescence	234
14.10.2	Étiquette GFP	234
14.11	Protocoles	234
14.11.1	Dosage des protéines	234
14.11.1.1	Préparation des solutions	235
14.11.1.2	Méthode spectrophotométrique	235
14.11.1.3	Méthode de Bradford	236
14.11.2	Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)	236
14.11.2.1	Préparation des solutions	237
14.11.2.2	Préparation du gel	238
A.	Montage des vitres	238
B.	Gel de séparation 10 % (≈10 ml)	238
C.	Gel de concentration 5% (≈4ml)	239
14.11.2.3	Montage du gel dans l'appareil	240
14.11.2.4	Préparation des échantillons	240
14.11.2.5	Migration des protéines	240
14.11.3	Coloration au bleu de Coomassie	241

14.11.3.1	Préparation des solutions	241
14.11.3.2	Coloration du gel	242
14.11.4	Buvardage à la western	242
14.11.4.1	Préparation des solutions	243
14.11.4.2	Transfert des protéines	244
14.11.4.3	Blocage de la membrane	245
14.11.4.4	Incubation avec les anticorps et lavages	245
14.11.4.5	Révélation	245
14.12	Résumé	246
14.13	Exercices	246

Chapitre 15 – Utilisation des techniques de biologie moléculaire en milieu clinique 247

15.1	Maladies génétiques héréditaires	248
15.1.1	Hémochromatose héréditaire (HH)	248
15.1.1.1	Méthodes diagnostiques classiques	250
15.1.1.2	Méthodes diagnostiques moléculaires	250
	A. PCR combiné à l'analyse des sites de restriction	250
	B. PCR allèle spécifique	250
15.1.2	Syndrome du X fragile	252
15.1.2.1	Méthodes diagnostiques	252
	A. Méthode d'analyse du gène <i>FMRI</i> par buvardage à la Southern	252
	B. Méthode d'analyse du gène <i>FMRI</i> par PCR	254
15.1.3	Autres maladies génétiques héréditaires	254
15.2	Oncologie	255
15.2.1	Leucémie myéloïde chronique (LMC)	255
15.2.1.1	Méthodes diagnostiques	256
	A. Identification du chromosome de Philadelphie par caryotypage	256
	B. Identification de la translocation t(9;22) par FISH	257
	C. Identification de l'ARNm hybride BCR/ABL par RT-PCR	257
15.2.2	Autres types de leucémies dont le diagnostic moléculaire est possible	258
15.3	Maladies infectieuses	258
15.3.1	Chlamydia et gonorrhée	258
15.3.1.1	Méthodes diagnostiques classiques	259
15.3.1.2	Méthodes diagnostiques moléculaires	259
	A. Prélèvements et préparation des échantillons	259
	B. Amplification des cibles	259
	C. Détection des amplicons	260
15.3.2	Autres maladies infectieuses	260
15.4	Identification d'individus	261
15.4.1	Analyse des polymorphismes	262
15.4.1.1	Analyse des VNTR	262
15.4.1.2	Analyse des STR	262
15.4.1.3	Analyse des STR du chromosome Y	263
15.4.1.4	Analyse de l'ADN mitochondrial	263
15.4.1.5	Analyse des SNP	264
15.5	Résumé	265

Chapitre 16 – Série de laboratoires 1	267
16.1 Diagnostic moléculaire de l'hémochromatose héréditaire de type 1	267
16.1.1 Extraction d'ADN à partir de prélèvements sanguins	268
16.1.2 Détection de la mutation C282Y par PCR allèle spécifique	268
16.1.2.1 Préparation des mélanges réactionnels	270
16.1.3 Migration sur gel d'agarose des réactions de PCR	271
16.2 Diagnostic de la leucémie myéloïde chronique	271
16.2.1 Extraction d'ARN à partir de prélèvements sanguins	273
16.2.1.1 Préparation des solutions	273
16.2.1.2 Extraction de l'ARN	275
A. Purification des globules blancs	275
B. Extraction de l'ARN	276
16.2.2 Transcription inverse de l'ARNm en ADNc	277
16.2.3 Première ronde de PCR	277
16.2.4 Deuxième ronde de PCR	278
16.2.5 Migration sur gel d'agarose	278
16.3 Élaboration d'une stratégie pour le diagnostic moléculaire du syndrome du X fragile	279
16.3.1 Recherche de la séquence du promoteur et du gène <i>FMR1</i> dans des bases de données publiées dans Internet	280
16.3.2 Création d'amorces de PCR pour amplifier un fragment approprié	280
16.3.3 Clonage de la sonde	280
Chapitre 17 – Série de laboratoires 2	281
17.1 Préparation du gène codant pour le facteur σ^{32} d' <i>Escherichia coli</i>	282
17.1.1 Amplification du gène par PCR	282
17.1.2 Vérification du PCR sur gel d'agarose	282
17.1.3 Purification du fragment de PCR	282
17.2 Clonage du gène dans un vecteur d'expression	284
17.2.1 Digestion de l'insert et du vecteur	284
17.2.2 Vérification et purification des digestions sur gel d'agarose	285
17.2.3 Ligation de l'insert et du vecteur, puis transformation	285
17.2.4 Vérification du clonage	286
17.3 Induction de l'expression de la protéine et purification par chromatographie d'affinité	286
17.3.1 Transformation de la bactérie BL21(DE3)	286
17.3.2 Induction de l'expression et purification de la protéine de fusion	286
17.4 Vérification de la purification de la protéine de fusion	287
17.4.1 Gel SDS-PAGE	287
17.4.2 Immunodétection de la protéine par buvardage à la western	287
Annexe I – Corrigé des exercices	289
Annexe II – Aide mémoire	297
Médiagraphie	301
Glossaire	307
Index	323