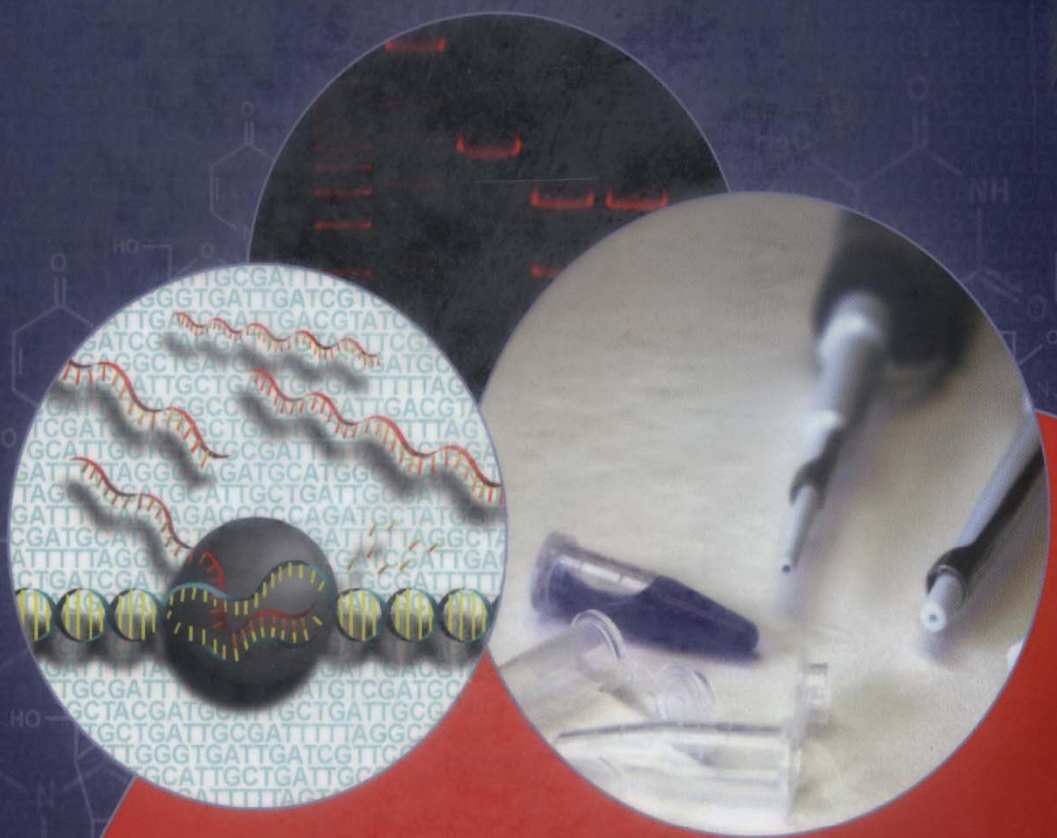


# Biologie moléculaire

Concepts · Techniques · Applications



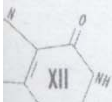
Joëlle Brodeur · Martin Toussaint



# TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 – ADN et ARN</b> .....	<b>3</b>
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
<b>Chapitre 2 – De l'ADN aux protéines</b> .....	<b>17</b>
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
<b>Chapitre 3 – Enzymes de modification de l'ADN</b>		<b>29</b>
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
<b>Chapitre 4 – Mutations et transmission des caractères génétiques</b>		<b>37</b>
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
<b>Chapitre 5 – Clonage moléculaire</b>		<b>47</b>
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

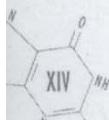
## **Chapitre 6 – Techniques d'analyse de l'ADN** **57**

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

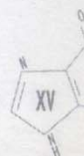
7.1.2	Souches utilisées	80
7.2	Sélection ou criblage des transformants	82
7.3	Extraction d'ADN plasmidique	83
7.3.1	Mini-préparation	84
7.3.2	Midi-préparation et maxi-préparation	86
7.4	Production et purification de protéines recombinantes	86
7.4.1	Système d'induction	86
7.4.1.1	Principales étiquettes 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
<b>Chapitre 8 – Étapes détaillées d'un clonage moléculaire</b>		<b>103</b>
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. Choisir un site unique dans le vecteur	110
	D. Choisir un 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



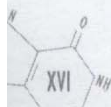
8.2.11	Identification des clones contenant la construction recherchée.....	122
8.2.12	Entreposage des transformants intéressants.....	124
8.3	Protocoles.....	124
8.3.1	Précipitation de l'ADN.....	124
8.3.1.1	Préparation des solutions.....	125
8.3.1.2	Précipitation de l'ADN.....	125
8.3.2	Extraction d'ADN 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



<b>Chapitre 10 – Sondes nucléiques</b>	<b>157</b>
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
<b>Chapitre 11 – Séquençage de l'ADN</b>	<b>171</b>
11.1 Principe	171
11.2 Automatisation	175
11.3 Séquençage du génome humain	176
11.4 Résumé	176
11.5 Exercices	177
<b>Chapitre 12 – Extraction et analyse de l'ADN</b>	<b>179</b>
12.1 Analyse <i>in vitro</i> 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 <i>in vivo</i> 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
<b>Chapitre 14 – Analyse des protéines</b>		<b>217</b>
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

<b>Chapitre 16 – Série de laboratoires 1</b>	<b>267</b>
16.1 Diagnostic moléculaire de l'hémochromatose héréditaire de type I	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
<b>Chapitre 17 – Série de laboratoires 2</b>	<b>281</b>
17.1 Préparation du gène codant pour le facteur $\sigma^{32}$ 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
<b>Annexe I – Corrigé des exercices</b>	<b>289</b>
<b>Annexe II – Aide mémoire</b>	<b>297</b>
<b>Médiagraphie</b>	<b>301</b>
<b>Glossaire</b>	<b>307</b>
<b>Index</b>	<b>323</b>

