

À LA CLINIQUE

DE LA BIOLOGIE

APPAREILS ET MÉTHODES EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Bernard Hainque, Bruno Baudin
et Philippe Lefebvre

Médecine-Sciences
Flammarion

**Appareils et méthodes
en biochimie
et biologie moléculaire**

Dans la même collection :

Biostatistique, par A.-J. Valleron
Biologie moléculaire et médecine, par J.-C. Kaplan et M. Delpech
Virologie humaine, par L. Collier et J. Oxford
Biochimie et biologie moléculaire, par P. Kamoun, A. Lavoigne et H. de Verneuil
Biochimie pathologique, par J. Delattre, G. Durand et J.-C. Jardillier
Immunologie, par J.-F. Bach et L. Chatenoud
Histologie, par J.-P. Dadoune
Bactériologie, par P. Berche, J.-L. Gaillard et M. Simonet
Génétique médicale – Thompson & Thompson, par M.W. Thompson, R.R. McInnes et H. Willard
Éléments de sécurité en biologie moléculaire, par J.-C. David

Chez le même éditeur :

Biochimie, par J.M. Berg, J.L. Tymoczko et L. Stryer
Atlas de poche de biochimie, par J. Koolman et K.-H. Röhm
Biochimie humaine, par F. Horn, G. Lindenmeier, C. Grillhöst, I. Moc, S. Berghold, N. Schneider et B. Münster
Aide-mémoire de biochimie et biologie moléculaire, par P. Kamoun
La biochimie de Lubert Stryer : le livre compagnon (5^e éd.)
Exercices et problèmes de biochimie, par P. Kamoun, C. Dode, M. Jeanpierre et D. Rabier
Biophysique, par A. Aurengo et T. Petitclerc
L'essentiel de la biologie cellulaire, par B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, A.J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter
Biologie moléculaire de la cellule, par B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter
Biologie moléculaire de la cellule, le livre d'exercices, par J. Wilson et T. Hunt
Atlas de poche de génétique, par E. Passarge
Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique, par R.D. Schmid
Atlas de poche d'immunologie, par G.R. Burmester et A. Pezzutto
Génomes, par T.A. Brown
Atlas de poche d'histologie, par W. Kühnel
Le monde du vivant, par W.K. Purves, G.H. Orians, H.C. Heller et D. Savada

Traité de médecine, par P. Godeau, S. Herson et J.-Ch. Piette
Principes de médecine interne Harrison, par E. Braunwald, A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo et J.L. Jameson
Guide du bon usage du médicament, par G. Bouvenot et C. Caulin
La petite encyclopédie médicale Hamburger, par M. Leporrier
Dictionnaire de médecine Flammarion, 8^e éd., par S. Kernbaum
Le Flammarion médical, par M. Leporrier
Dictionnaire français-anglais/anglais-français des termes médicaux et biologiques et des médicaments, par G.S. Hill
L'anglais médical : *spoken and written medical english*, par C. Coudé et F.-X. Coudé

Collection de la biologie à la clinique

Bernard HAINQUE

Bruno BAUDIN

Philippe LEFEBVRE

**Appareils et méthodes
en biochimie
et biologie moléculaire**

Médecine - Sciences

Flammarion

87, quai Panhard et Levassor, 75013 Paris

<http://www.medecine.flammarion.com>

Direction éditoriale : Andrée Piekarski
Secrétariat d'édition : Béatrice Brottier
Fabrication : Carine Weber
Couverture : Studio Flammarion

Pour recevoir le catalogue Flammarion Médecine-Sciences,
il suffit d'envoyer vos nom et adresse à :

Flammarion Médecine-Sciences

87, quai Panhard-et-Levassor
75013 Paris

Pour être informé(s) de **nos nouvelles parutions** et des événements
auxquels nous participons, abonnez-vous gratuitement
à notre **Newsletter mensuelle** sur le site :
www.medecine.flammarion.com

ISBN : 978-2-2571-6545-9
© 2008, Flammarion SA.

Liste des collaborateurs

- AUZEIL Nicolas, Maître de Conférences des Universités, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes.
- BAUDIN Bruno, Professeur des Universités, Biochimie et Biologie cellulaire, JE2493, UFR de Pharmacie, université Paris 11-Sud, Châtenay-Malabry ; Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie), Service de Biochimie A, hôpital Saint-Antoine, Paris.
- BIDART Jean-Michel, Professeur des universités, Biotechnologies, UFR de Pharmacie, université Paris 11-Sud, Châtenay-Malabry ; Praticien hospitalier, Biologiste, Chef du département de Biologie et Pathologies médicales, institut Gustave-Roussy, Villejuif.
- BONNEFONT-ROUSSELOT Dominique, Professeur des Universités, Biochimie, laboratoire de Biochimie métabolique et clinique (EA 3617), UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes ; Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie), unité fonctionnelle de Biochimie des Maladies métaboliques, service de Biochimie métabolique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.
- DARDEL Frédéric, Professeur des Universités, laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, CNRS-UMR 8015, UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes.
- DUGAY Annabelle, Maître de Conférences des Universités, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes.
- FOMPEYDIE Dominique, Maître de Conférences des Universités, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes ; Praticien attaché, Pharmacien-Biologiste, laboratoire de Toxicologie biologique, hôpital Lariboisière, Paris.
- GRAMOND Jean-Pierre, Maître de Conférences des Universités (retraité), Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes.
- HAINQUE Bernard, Professeur des Universités, Génomique fonctionnelle et Physiopathologie moléculaire, UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes ; Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie), Chef du service de Biologie métabolique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.
- KAMOUN Pierre, Professeur Émérite des Universités, université Paris-Descartes ; Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie et Biologie moléculaire), ancien Chef du service de Biochimie médicale, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.
- LACROIX Ludovic, Praticien assistant, Biologiste, département de Biologie et Pathologies médicales, institut Gustave-Roussy, Villejuif.
- LEFEBVRE Philippe, Maître de Conférences des Universités, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes ; Praticien attaché, Pharmacien-Biologiste, laboratoire de Toxicologie biologique, hôpital Lariboisière, Paris.
- MARIO Nathalie, Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie), service de Biochimie A, hôpital Saint-Antoine, Paris.
- MENET Marie-Claude, Maître de Conférences des Universités, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes ; Praticien attaché, Biologiste (Biochimie), unité fonctionnelle de Biochimie des Maladies neurométaboliques, service de Biochimie métabolique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.
- POUPON Joël, Praticien hospitalier, Pharmacien-Biologiste, laboratoire de Toxicologie biologique, hôpital Lariboisière, Paris.
- REGAZZETTI Anne, Ingénieur d'études, Chimie analytique, faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris-Descartes.
- STERNBERG Damien, Praticien hospitalier, Biologiste (Biochimie), unité fonctionnelle de Cardiogénétique et Myogénétique moléculaire et cellulaire, service de Biochimie métabolique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.
- VILLETTE Jean-Marie, Praticien hospitalier, Pharmacien-Biologiste, laboratoire de Biochimie, hôpital Saint-Louis, Paris.

Sommaire

Avant-propos , par B. BAUDIN, B. HAINQUE et Ph. LEFEBVRE	XVII
---	------

Méthodes générales

Chapitre 1. Unités, instrumentation et métrologie , par B. BAUDIN, P. KAMOUN et N. MARIO	3
Unités.....	3
Unités de base.....	3
Unités dérivées.....	3
Unités d'électricité usuelles.....	5
Utilisation des gaz.....	5
Commercialisation des gaz.....	5
Utilisation des gaz.....	5
Production de vide.....	8
Trompes à vide.....	8
Pompes à vide.....	8
Production de chaleur.....	8
Combustion d'un gaz.....	8
Chauffage d'une résistance électrique.....	9
Autres modes de chauffage.....	11
Production de froid et lyophilisation.....	11
Réfrigérateurs et congélateurs.....	11
Neige carbonique et azote liquide.....	11
Lyophilisation.....	11
Volumétrie et matériel courant de laboratoire.....	12
Matériel de volumétrie.....	12
Matériel courant au laboratoire.....	14
Balances.....	15
Caractéristiques des balances et différents types.....	15
Dosages gravimétriques.....	16
Chapitre 2. Préparation des réactifs , par B. BAUDIN, P. KAMOUN et N. MARIO.....	17
Purification de l'eau.....	17
Eau de ville.....	17
Les différents types d'eau purifiée.....	17
Conservation et utilisation des eaux purifiées.....	18
Mesure du pH et solutions tampons.....	18
Mesure du pH.....	18
Étalonnage et solutions d'étalonnage.....	20
Solutions tampons.....	21
Produits et réactifs chimiques.....	24
Produits chimiques.....	24
Préparation des solutions.....	24
Osmolalité d'une solution tampon.....	26

Bioréactifs.....	27
Principes de marquage et méthodes quantitatives	27
Méthodes qualitatives et amplification du signal.....	28
Chapitre 3 Préparation des échantillons biologiques , par B. BAUDIN et N. MARIO	30
Sang	30
Modes de prélèvement	30
Conditions de prélèvement	30
Utilisation du prélèvement	30
Anticoagulants	31
Conservation	31
Interférences	31
Urines	32
Autres liquides biologiques	32
Tissus.....	32
Chapitre 4. Méthodes d'extraction et de fractionnement , par B. BAUDIN, D. BONNEFONT-ROUSSELOT, P. KAMOUN et D. STERNBERG	34
Précipitations et extractions sélectives	34
Précipitation des protéines	34
Extraction des protéines membranaires.....	35
Extraction des acides nucléiques.....	35
Dialyse.....	40
Membranes de dialyse	40
Facteurs influençant la dialyse	40
Méthodes de dialyse	41
Applications de la dialyse.....	42
Filtration	42
Principes.....	42
Procédés de filtration	43
Différents types de filtres	43
Ultrafiltration.....	44
Centrifugation et ultracentrifugation.....	45
Définitions	45
Principes de la centrifugation	45
Appareillages.....	46
Ultracentrifugation préparative	47
Applications de la centrifugation en biochimie et biologie moléculaire	49
Chapitre 5. Bonnes pratiques de laboratoire , par N. MARIO	50
Notions générales.....	50
Définition de la qualité.....	50
Réglementation	50
Procédures.....	51
Phase pré-analytique.....	51
Prélèvement des échantillons.....	51
Conservation et transport des échantillons.....	51
Réception et enregistrement des échantillons	52
Phase analytique.....	52
Instrumentation et réactifs	52

Validation d'une méthode d'analyse quantitative (dosage)	52
Contrôle de qualité	55
Phase post-analytique	56

Méthodes d'identification et de dosage des biomolécules

Chapitre 6. Méthodes spectroscopiques , par D. FOMPEYDIE et Ph. LEFEBVRE	59
Propriétés de la lumière, par Ph. LEFEBVRE	59
Nature de la lumière	59
Différents domaines des ondes électromagnétiques	60
Diffraction de la lumière	60
Réflexion et réfraction de la lumière	61
Diffusion de la lumière	62
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire, par Ph. LEFEBVRE	62
Émission de rayonnements	62
Absorption de la lumière	63
Appareillage	64
Spectrophotométrie dérivée, par D. FOMPEYDIE	78
Principe de la méthode	78
Aspect des courbes	78
Conséquences	78
Appareillage	79
Intérêt de la dérivation	79
Applications	80
Photométrie des milieux troubles : turbidimétrie et néphélométrie, par D. FOMPEYDIE et Ph. LEFEBVRE ...	81
Principe	81
Appareillage	81
Applications	81
Chapitre 7. Spectroscopie moléculaire par luminescence , par N. AUZEIL et A. REGAZZETTI	83
Généralités. Principes de la fluorescence	83
Excitation de la molécule par absorption d'un photon	84
Devenir d'une molécule excitée	84
Signal de fluorescence	85
Grandeurs caractéristiques du processus de fluorescence	86
Disparition de la fluorescence	90
Phénomènes liés à la fluorescence	93
Anisotropie et polarisation de fluorescence	93
Fluorescence par transfert d'énergie par résonance (FRET)	95
Spectrofluorimétrie	96
Spectrofluorimètres	97
Recommandations pour les analyses effectuées par spectrofluorimétrie	98
Molécules fluorescentes	99
Généralités	99
Fluorophores intrinsèques	99
Fluorophores extrinsèques	100
Quelques applications de la fluorescence	109
Applications biochimiques de la polarisation de fluorescence	109
Détection et dosage par CLHP couplée à une détection par fluorescence	111
Chimiluminescence et bioluminescence	111
Chimiluminescence	111
Bioluminescence	114
Applications	115

Chapitre 8. Spectrométries d'absorption et d'émission atomiques , par J. POUPON	120
Principe général	120
Aspects théoriques et appareillage	120
Atome et théorie quantique	120
Spectrométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF)	122
Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAET)	123
Spectrométrie d'émission atomique en flamme (photométrie de flamme)	127
Spectrométrie d'émission atomique en plasma couplé induit haute fréquence (ICP-OES)	127
Couplages et spéciation	129
Chapitre 9. Spectrométrie de masse	130
Introduction générale et définitions, par M.-C. MENET	130
Spectromètre de masse	130
Spectre de masse	131
Masse	131
Exactitude de masse	132
Résolution	132
Sensibilité	132
Limite de masse	132
Ions	132
Analyse des molécules organiques : biomolécules simples et macromolécules, par M.-C. MENET.	132
Principes et appareillages	132
Couplage des méthodes séparatives avec la spectrométrie de masse	144
Applications	144
Analyse des molécules inorganiques et des éléments minéraux par spectrométrie de masse en plasma induit, par J. POUPON	153
Principes et appareillages	153
Interférences en ICP-MS et systèmes de correction des interférences	154
Applications	156
Chapitre 10. Méthodes électrochimiques et potentiométriques , par A. DUGAY	158
Méthodes électrochimiques	158
Voltamétrie ou voltampérométrie	158
Potentiométrie, ampérométrie et coulométrie	161
Applications des méthodes électrochimiques	163
Méthodes potentiométriques	166
Électrodes indicatrices métalliques	166
Électrodes indicatrices à membrane sélective ou électrodes spécifiques	168
Méthodes de calcul de la concentration	176
Applications de la potentiométrie en biochimie clinique	177
Chapitre 11. Méthodes isotopiques , par P. KAMOUN et J.-M. VILLETTE	180
Structure de l'atome	180
Radioactivité	180
Émission alpha (α)	180
Émission bêta (β)	180
Émission gamma (γ)	181
Lois de la radioactivité	181
Détection et mesure de la radioactivité	182
Chapitre 12. Méthodes enzymatiques , par B. BAUDIN	187
Définition des enzymes et spécificité	187
Spécificité	187
Site actif	187
Mécanismes de la catalyse	187

Aspects cinétiques	188
Relation de Michaelis-Menten et inhibiteurs enzymatiques	189
Enzymes allostériques	191
Classification des enzymes et principales coenzymes	192
Détermination des activités enzymatiques	194
Dosage de substrats par des méthodes enzymatiques	196
Enzymes-réactifs de laboratoire	198
Marquage des enzymes pour immunodosage	198
Biocapteurs enzymatiques	199
Autres emplois des enzymes	199
Purification des enzymes	199
Chapitre 13. Méthodes immunologiques , par J.-M. BIDART et L. LACROIX	201
Principes généraux	201
Anticorps et antigène	201
Réaction antigène-anticorps	202
Production des anticorps	202
Production et caractéristiques des anticorps polyclonaux	202
Production et caractéristiques des anticorps monoclonaux	203
Ingénierie des anticorps	204
Principales méthodes immunologiques	205
Méthodes fondées sur la précipitation ou l'agglutination	205
Méthodes fondées sur l'utilisation de réactifs marqués	206
Vers des méthodes immunologiques sans anticorps	212
Méthodes multiplex	212
De la sensibilité des immunodosages	213
De la modification des anticorps à leur substitution par des aptamères	214
Chapitre 14. Méthodes chromatographiques : généralités , par Ph. LEFEBVRE	216
Différents types de chromatographies	216
Chromatographie planaire	216
Chromatographie en phase gazeuse	216
Chromatographie en phase liquide	216
Principaux mécanismes de séparation chromatographique	216
Chromatographie d'adsorption	216
Chromatographie de partage	217
Chromatographie d'échange d'ions	217
Chromatographie d'exclusion stérique	217
Chromatographie d'affinité	217
Principales données théoriques	217
Coefficient de partage	217
Grandeurs de rétention	218
Efficacité de la colonne	218
Qualité de la séparation	219
Chapitre 15. Chromatographie planaire , par Ph. LEFEBVRE	221
Chromatographie sur papier	221
Chromatographie sur couches minces	221
Principe	221
Mécanismes de séparation	221
Conduite d'une CCM	222
Grandeurs caractéristiques	224

Chapitre 16. Chromatographie en phase gazeuse , par J.-P. GRAMOND et Ph. LEFEBVRE.	226
Principes de la séparation.	226
Interactions moléculaires dispersives.	226
Interactions moléculaires polaires.	226
Appareillage.	226
Gaz vecteur.	226
Colonne.	227
Modes d'injection.	229
Détection.	235
Préparation de l'échantillon.	237
Extraction.	237
Dérivation.	237
Optimisation de l'analyse.	237
Choix du gaz vecteur.	237
Température d'analyse.	238
Anomalies rencontrées lors de l'acquisition d'un chromatogramme.	238
Quantification : méthode de l'étalonnage interne.	238
Chapitre 17. Chromatographie liquide à haute performance	240
Interactions moléculaires, par M.-C. MENET.	240
Moment dipolaire.	241
Interactions.	241
Évaluation de la polarité d'une molécule organique.	241
Évaluation de l'hydrophobie d'une molécule organique.	242
Couples phase stationnaire/phase mobile. Mécanismes de rétention, par M.-C. MENET.	242
Chromatographie d'adsorption.	242
Chromatographie de partage.	243
Chromatographie d'échange d'ions.	245
Chromatographie d'exclusion stérique.	247
Séparation des molécules chirales.	249
Optimisation en chromatographie en phase liquide, par M.-C. MENET.	251
Augmentation de la résolution par modification du facteur de rétention k'	251
Augmentation de la résolution par augmentation de la sélectivité α	252
Augmentation de la résolution par augmentation de l'efficacité N	252
Appareillage en chromatographie liquide, par P. LEFEBVRE et M.-C. MENET.	254
Pompes.	254
Systèmes d'injection.	257
Colonnes.	257
Détecteurs.	258
Chapitre 18. Dérivation en chromatographie , par Ph. LEFEBVRE.	262
Dérivation en chromatographie en phase gazeuse.	262
Réactions de silylation.	262
Réactions d'acylation.	264
Réactions d'alkylation.	266
Dérivation en chromatographie liquide à haute performance.	266
Dérivation pour l'extraction.	266
Dérivation pour la séparation.	267
Dérivation pour la détection.	270
Dérivation pré- ou post-colonne.	271
Chapitre 19. Méthodes électrophorétiques , par B. BAUDIN.	274
Principes généraux de l'électrophorèse.	274
Mobilité électrophorétique et facteurs influants.	274
Courants électro-osmotiques et effet Joule.	275

Électrophorèse de zone	275
Définition et ionisation des macromolécules biologiques	275
Caractéristiques	276
Supports	276
Méthodologies en électrophorèse de zone	277
Méthodes de révélation	282
Électrophorèse préparative	284
Électrophorèse préparative sur gel	284
Électrophorèse préparative sur colonne	284
Électrophorèse à écoulement libre ou <i>free flow electrophoresis</i>	285
Électrophorèse en veine liquide et électrophorèse capillaire	285
Principes et avantages de l'électrophorèse capillaire	285
Principales méthodes utilisées en électrophorèse capillaire	286
Appareils	288

Méthodes d'étude des macromolécules

Chapitre 20. Purification des macromolécules par chromatographie liquide , par B. BAUDIN	291
Matériels	291
Colonnes	291
Pompes	292
Détecteurs	292
Collecte des fractions et traitement du signal	292
Aspects quantitatifs	293
Chromatographie d'exclusion stérique	293
Principe	293
Colonnes d'exclusion stérique et tampons de travail	293
Applications préparatives aux macromolécules	294
Chromatographie d'échange d'ions	296
Principe général	296
Application aux protéines	296
Application aux acides nucléiques et autres molécules biologiques	297
Colonnes et tampons de travail	297
Chromatographies d'adsorption et de partage	298
Chromatographie sur hydroxyapatite	298
Chromatographie sur colorants chimiques	298
Chromatographie sur chélates métalliques ou <i>immobilized metal affinity chromatography</i>	298
Chromatographie d'interactions hydrophobes	299
Chromatographie en phases inversées	300
Chromatographie d'affinité	300
Affinité chimique	300
Affinité biologique	301
Chapitre 21. Méthodes d'étude structurale des macromolécules , par B. BAUDIN, F. DARDEL et D. STERNBERG	303
Purification et dosage des protéines, par B. BAUDIN	303
Purification des protéines	303
Dosage des protéines	304
Quantification de l'ADN et l'ARN, par D. STERNBERG	306
Purification des acides nucléiques	306
Dosage de l'ADN et de l'ARN	306

Étude de la structure primaire, par B. BAUDIN, avec D. STERNBERG	308
Composition chimique des protéines et peptides	308
Détermination de la séquence	309
Détermination de la masse, de la taille et de la forme, par B. BAUDIN.....	314
Notions de masse moléculaire, de forme et de taille.....	314
Méthodes d'étude directes et méthodes biochimiques	314
Analyses de sédimentation par ultracentrifugation.....	315
Méthodes utilisant la diffusion de la lumière	317
Méthodes d'analyse des structures secondaire et tertiaire.....	317
Rappel sur les différents niveaux structuraux des macromolécules, par B. BAUDIN	317
Dichroïsme circulaire appliqué à l'étude des protéines, par B. BAUDIN.....	318
Études par radiocristallographie et RMN-2D, par F. DARDEL.....	319

Méthodes d'étude en biologie moléculaire

Chapitre 22. Principes, méthodes et outils en biologie moléculaire , par D. STERNBERG.....	329
L'hybridation, propriété fondamentale des acides nucléiques.....	330
Forces à l'origine de l'appariement en double hélice	330
Facteurs de transition entre état apparié et état non apparié	330
Notion de température de fusion (T _m) et de courbe de fusion.....	330
Méthodes de caractérisation du génome ou du transcriptome fondées sur la reconnaissance par hybridation....	332
Outils enzymatiques de modification et de synthèse des acides nucléiques.....	334
Introduction et revue générale	334
Endonucléases de restriction de l'ADN double brin	335
Propriétés des ADN polymérases utilisant des matrices ADN et ARN	335
Méthodes d'étude de l'ARN utilisant la synthèse d'ADN à partir d'ARN (transcription inverse).....	336
Introduction générale.....	336
Types d'amorçage pour la RT (synthèse des brins antisens).....	337
Transcriptases inverses utilisables pour la RT	338
Méthodes utilisées pour la synthèse du second brin (si nécessaire).....	338
Problème de la représentativité qualitative et quantitative du produit final de RT éventuellement amplifié.....	339
Méthodes de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)	339
Présentation générale de la réaction.....	339
Historique de la PCR	340
Cinétiques théorique et réelle de la synthèse d'ADN au cours de la PCR	341
Variétés des réactifs et des conditions réactionnelles en PCR	341
Échantillons d'ADN ou d'ARN introduits dans le mélange réactionnel de la PCR	343
Utilisation de standards dans une PCR.....	344
Les conditions thermiques de la réaction de PCR et leur contrôle	344
Optimisation d'une PCR.....	345
Quantification du nombre de copies d'une séquence d'acide nucléique par (RT-)PCR en temps réel ...	345
Dispositifs moléculaires d'émission de fluorescence utilisés.....	346
Normalisation par rapport à un fluorochrome passif.....	348
Modes d'expression des mesures.....	348
Gamme dynamique et efficacité.....	348
(RT-)PCR quantitative avec standard endogène et méthode des $\Delta\Delta C_t$	349
Méthodes de détection de mutations ponctuelles de l'ADN	350
Méthode fondée sur la détection des polymorphismes de restriction (RFLP)	350
Étude des polymorphismes conformationnels des simples brins par SSCP	351
Méthodes fondées sur la détection des hétéroduplex ou des mésappariements.....	353
Électrophorèse sur gel en gradient de dénaturation (DGGE).....	353
Chromatographie liquide à haute performance en conditions de dénaturation (DHPLC).....	358

Chapitre 23. Aperçus sur le clonage de l'ADN , par D. STERNBERG	362
Les quatre étapes du clonage	362
Génération des fragments d'ADN : étape 1	362
Choix et préparation du vecteur, et jonction de l'ADN d'intérêt à l'ADN vecteur : étape 2	362
Introduction de l'ADN vecteur greffé dans les cellules hôtes : étape 3	362
Criblage des cellules hôtes ayant incorporé le vecteur greffé : étape 4	364
Quelques vecteurs de clonage	365
Contraintes concernant l'ADN insérable	365
Plasmides bactériens sauvages	366
Phages	367
Systèmes hybrides	369
Conclusion	371
Chapitre 24. Puces à ADN. Méthodes d'étude du génome et du transcriptome , par J.-M. BIDART et L. LACROIX	372
Principe général	373
Les différents types de puces à ADN	375
Densité	375
Support	375
Système de détection	376
Type de séquences utilisées comme sondes	377
Fabrication des puces à ADN	378
Préparation des échantillons, amplification, marquage et hybridation des cibles	378
Préparation des échantillons d'acides nucléiques	378
Amplification et marquage des cibles	378
Hybridation et lavage	378
Analyse bio-informatique et biostatistique	379
Acquisition des images	379
Normalisation, filtrage et représentation des données	379
Analyse biostatistique des données d'expression génique	380
Conclusion	382
Exemple d'application	383
Méthodes d'étude des interactions moléculaires	
Chapitre 25. Interactions ligands-récepteurs , par B. BAUDIN et B. HAINQUE	387
Classification des interactions moléculaires	387
Principes de caractérisation des liaisons ligand-site récepteur	387
Méthodes expérimentales	389
Méthodes ne modifiant pas l'équilibre	389
Méthodes susceptibles de modifier l'équilibre	389
Analyse des interactions en temps réel	389
Mise en évidence de résidus fonctionnels et de zones d'interactions	390
Méthodes physiques	390
Méthodes chimiques	392
Méthodes biologiques	394
Étude des complexes protéiques	395
Méthodes d'étude des interactions protéine-protéine in vivo	395
Méthodes d'étude des interactions protéine-protéine in vitro	406

Chapitre 26. Interactions acides nucléiques-protéines , par B. HAINQUE.....	408
Diversité des objectifs et des approches méthodologiques	408
Place des méthodes de purification dans l'étude des interactions acides nucléiques-protéines.....	409
Place des méthodes de clonage dans l'étude des interactions acides nucléiques-protéines	410
Détermination des caractéristiques des interactions acides nucléiques-protéines	411
Méthodes d'étude des interactions ADN-protéines.....	412
Filtration sur membrane de nitrocellulose	412
Retardement sur gel.....	412
Balises moléculaires et FRET ou BRET	414
Empreinte in vitro (protection de l'ADN vis-à-vis de réactifs de clivage, enzymatiques ou chimiques)	415
Interférence par modification de nucléotides.....	419
Formation de liaisons covalentes ADN-protéines par irradiation UV	420
Empreinte in vivo par méthylation des purines	421
Identification des protéines de liaison à l'ADN par le système simple hybride	422
Identification des motifs nucléotidiques par sélection itérative et amplification par PCR des sites de liaison à partir d'un pool d'oligonucléotides de séquence variable	424
Exploration de la localisation génomique des protéines associées in vivo à la chromatine par immunoprécipitation...	425
Méthodes d'étude des interactions ARN-protéines	427
Retardement sur gel.....	427
Empreinte in vitro (protection de l'ARN vis-à-vis de réactifs de clivage chimiques)	427
Formation de liaisons covalentes ARN-protéines par irradiation UV.....	428
Reconstitution in vitro et purification des complexes ARN-protéines	429
Identification des protéines de liaison aux ARN par le système triple hybride.....	429
Sélection in vitro des ARN fonctionnels	431
L'essor de nouvelles méthodes	431
Liste des abréviations	433
Index	437

Avant-propos

Cette nouvelle version du livre original de Pierre Kamoun *Appareils et méthodes en biochimie*, réédité en 1997 dans sa dernière version sous le titre *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*, est l'aboutissement d'un profond remaniement et de mises à jour conséquentes, imposés par l'importance des développements, au cours de cette décennie, des méthodes analytiques tant en biochimie qu'en génétique moléculaire, voire dans toutes les sciences qui sont à leurs frontières. Le Professeur Pierre Kamoun nous a confié la lourde tâche d'une réédition qui offrirait plus de place aux méthodes actuelles ou émergentes et qui serait plus complète quant à son champ interdisciplinaire, sans néanmoins déborder vis-à-vis des méthodes d'étude de la cellule ou en physiologie et même en génétique, bien que les interfaces soient nombreuses.

Dès la première partie, une attention particulière a porté sur la préparation des réactifs, des échantillons biologiques et les bonnes pratiques de laboratoire, après un bref rappel sur la métrologie (science des mesures).

Dans la deuxième partie consacrée aux méthodes d'identification et de dosage des biomolécules, tous les chapitres ont été entièrement refondés en donnant une place importante à la spectrométrie de masse, aux méthodes utilisant la luminescence et aux méthodes électrochimiques et potentiométriques. Les méthodes chromatographiques sont largement détaillées ; les méthodes enzymatiques, immunologiques et électrophorétiques ont été réécrites en développant plus particulièrement les méthodes plus récentes telles l'électrophorèse capillaire et l'analyse protéomique.

La troisième partie est entièrement nouvelle ; en effet, nous avons tenu à présenter séparément les méthodes d'étude des macromolécules, méthodes tantôt chimiques, physicochimiques, physiques ou encore biologiques, dont certaines sont abordées dans les parties précédentes ; ces méthodes sont l'essence même de la biochimie à la frontière de la biophysique.

La quatrième partie, réservée aux méthodes d'étude en biologie moléculaire, a bénéficié d'un important remaniement et a été amendée de l'analyse transcriptomique liée au développement des puces à ADN.

Autre grande nouveauté, la cinquième partie est consacrée aux méthodes d'étude des interactions moléculaires ; cette problématique est au cœur des réflexions scientifiques actuelles et donne la part belle à la biologie moléculaire et à la biochimie des macromolécules traitées dans les deux parties précédentes.

L'ordre de ces cinq parties n'est donc pas le fruit du hasard ; il est fondé sur une graduation de l'étude des « petites » molécules inorganiques et organiques (chimie analytique classique) vers celle des macromolécules du vivant et de leurs interactions.

Du livre de Pierre Kamoun, nous avons en revanche retiré la dernière partie qui était dévolue à l'analyse statistique, à la fois pour des contraintes de place et parce que nous avons pensé, d'une part, que les méthodes statistiques sont devenues très complexes et qu'elles seront donc sans aucun doute beaucoup mieux traitées dans les ouvrages de mathématiques spécialisés en statistique, et, d'autre part, que l'approche mathématique, même si nous y faisons souvent référence, s'écarte de notre propos centré sur les molécules, « petites » et « grandes », du vivant.

Nous avons fait de notre mieux pour rendre ce texte intéressant et lisible pour le plus grand nombre d'entre nous, non seulement les étudiants des premier (L) et deuxième cycles scientifiques (M) tant en Sciences de la vie, Médecine, Pharmacie que dans les sections à connotation « biologique » des IUT et écoles d'ingénieurs, mais aussi les techniciens et les chercheurs des unités axées vers la biologie ou à l'interface biologie/physique/chimie. Gageons que les chapitres les plus « chimiques » ou « physiques » s'avèreront utiles aux biologistes en quête de savoir technologique, et que les chapitres plus proches de la biochimie et de la biologie moléculaire classiques apporteront une base de connaissance utile aux chimistes « purs » qui, dans leur recherche ou leur activité courante de laboratoire, doivent s'ouvrir au monde du vivant.

Chaque chapitre se termine par « Pour en savoir plus », avec des références bibliographiques (livres, revues ou articles) ; parfois s'y ajoutent des sites internet dont certains renvoient vers des firmes commerciales. Un index de plus de 2 000 termes, souvent avec plusieurs niveaux d'indexation, devrait permettre de retrouver rapidement les sections du texte afférentes à ce terme, ce qui peut amener à consulter plusieurs chapitres, d'une même partie ou de parties différentes.

Nous avons enfin cherché à garder l'esprit originel de l'ouvrage de Pierre Kamoun qui en a fait le succès : expliquer les principes des méthodes avec la rigueur suffisante pour en comprendre les aspects pratiques sans théoriser excessivement. Nous espérons que cette nouvelle édition apportera non seulement les éléments essentiels pour appréhender les méthodologies nouvelles, mais aussi qu'elle aidera le lecteur à envisager celles qu'il pourrait être amené à mettre en œuvre. Nous dédions cette nouvelle version bien évidemment au Professeur Pierre Kamoun que nous remercions sincèrement pour la confiance dont il nous a fait part ainsi qu'à nos maîtres biochimistes qui nous ont fait découvrir et aimer cette immense discipline qu'est la biochimie.

Bruno BAUDIN, Bernard HAINQUE
Philippe LEFEBVRE

