

TOUT EN FICHES

L'ESSENTIEL DE
BIOTECHNOLOGIES

Fabien CÉZARD

Professeur en CPGE au lycée Pierre-Gilles de Gennes/ENCPB.

DUNOD

La précédente édition de cet ouvrage est parue dans la collection Express SUP.
Une autre version de cet ouvrage a été publiée dans la même collection sous
le titre *Biotechnologies BTS*.

© Dunod, 2009, 2013, 2019
11 rue Paul Bert, 92240 Malakoff
ISBN 978-2-10-079986-2
www.dunod.com

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Préface

Alors que s'engage la réforme du lycée à l'horizon de 2021, l'enseignement des biotechnologies renouvelle sa promesse d'être une discipline formatrice par la double dimension qu'elle propose, d'articuler des concepts scientifiques et technologiques. Celle-ci garantit aux lycéens et étudiants qui veulent faire de la biologie aujourd'hui, une formation riche les projetant vers l'avenir. En effet, les biotechnologies étant en constante évolution, de nouvelles découvertes liées aux potentialités du vivant permettent de produire de nouveaux outils technologiques qui vont, à leur tour, faire avancer la recherche en biologie.

Dans cet ouvrage consacré aux étudiants de cursus scientifiques et technologiques, les concepts-clés sont mis en exergue et la structure en fiche permet de décrypter rapidement les éléments essentiels. Cette nouvelle édition présente de nouvelles technologies et de nouvelles illustrations, qui viennent éclairer certains points. Il est un outil précieux d'appropriation des concepts et de renforcement des compétences liées à la pratique expérimentale.

Focalisé sur les grands principes qui fondent des techniques les plus couramment enseignées dans différentes formations du supérieur (BTS de biologie appliquée, CPGE TB ou BCPST, DUT de génie biologique, L1-L2) ce manuel permet également d'exploiter les résultats expérimentaux. De nombreux liens sont faits entre les différentes fiches qui montrent les interconnexions entre les principes et méthodes, et permettent à l'étudiant d'avoir une vision globale sur l'ensemble des biotechnologies.

Dix années après la première édition, l'ouvrage *Biotechnologies* de Fabien Cézard, professeur agrégé de Biochimie-Génie Biologique, s'avère rigoureux, explicite et concis. Ces fiches seront appréciées dans cette forme éditoriale riche et diversifiée qui facilite l'appropriation des concepts, ainsi que leur mobilisation dans les exercices proposés.

Caroline Bonnefoy,
Inspectrice Générale de l'Éducation Nationale

Table des matières

Avant-propos	6
Fiche 1. Molécules & solutions	9
Partie 1 : Culture cellulaire et entretien des cellules eucaryotes	
Fiche 2. Milieux & matériels de culture cellulaire	16
Fiche 3. Entretien des lignées cellulaires	21
Fiche 4. Quantification des cellules vivantes	25
Partie 2 : Techniques immunologiques	
Fiche 5. Agglutination immunologique	33
Fiche 6. Précipitation immunologique	37
Fiche 7. Neutralisation immunologique	42
Fiche 8. Immunomarquage par immunofluorescence	46
Fiche 9. Immunodosage (1) : radio-immunologie et immunoenzymologie	52
Fiche 10. Immunodosage (2) : améliorations	59
Partie 3 : Techniques enzymatiques	
Fiche 11. Catalyse enzymatique	66
Fiche 12. Inhibitions enzymatiques	75
Fiche 13. Activité catalytique	81
Fiche 14. Dosage enzymatique de substrats	86
Fiche 15. Allostérie (enzymatique)	90

Partie 4 : Séparation et purification des biomolécules

Fiche 16.	Fractionnement subcellulaire (1) : préparation des extraits cellulaires	104
Fiche 17.	Fractionnement subcellulaire (2) : centrifugations	108
Fiche 18.	Purification des protéines par précipitation	118
Fiche 19.	Dialyse à l'équilibre	127
Fiche 20.	Chromatographie (1) : notions générales	138
Fiche 21.	Chromatographie (2) : liquide-liquide basse pression	148
Fiche 22.	Chromatographie (3) : liquide-solide basse pression	153
Fiche 23.	Chromatographie (4) : améliorations	165
Fiche 24.	Bilan sur la purification d'une protéine	176
Fiche 25.	Extraction et purification des acides nucléiques	184
Fiche 26.	Électrophorèse (1) : séparation des acides nucléiques et des protéines	195
Fiche 27.	Électrophorèse (2) : améliorations	206

Partie 5 : Analyse des acides nucléiques et des protéines

Fiche 28.	Dénaturation et hybridation des acides nucléiques	212
Fiche 29.	Amplification d'acides nucléiques (1) : PCR en point final	218
Fiche 30.	Amplification d'acides nucléiques (2) : PCR en temps réel	228
Fiche 31.	Détection des acides nucléiques et des protéines : les « blots »	236
Fiche 32.	Séquençage des acides nucléiques (1) : techniques historiques	241
Fiche 33.	Séquençage des acides nucléiques (2) : améliorations	247
Index		259

Avant-propos

Cette troisième édition a été revue sur de nombreux points :

- réécriture et modifications de certaines fiches, avec notamment l'introduction de nouvelles illustrations plus explicites, ainsi que l'ajout de nouvelles techniques de pointe ;
- des précisions et des corrections ;
- de nouveaux exercices pour certaines fiches, et une réécriture de certains autres (notamment de leur correction) ;
- six fiches supplémentaires : généralités sur les molécules et les propriétés des solutions, améliorations des techniques d'immunodosage, allostérie enzymatique, dialyse à l'équilibre, et deux fiches sur le séquençage des acides nucléiques.

Un grand merci à Christine Benayoun, Claudine Walther, Élisabeth Mathieu, Florian Sonthonnax et Alexandra Bénévant pour leurs idées, leurs conseils et leurs relectures.

1. Liaisons et interactions en biologie

Les molécules se forment par **liaison d'atomes** et peuvent interagir entre elles. Les liaisons ont plusieurs rôles :

- **formation** des molécules : acquisition d'une **configuration** ;
- **structuration** des molécules : acquisition de leur **conformation** ;
- **interactions** intermoléculaires.

Liaison forte = liaison covalente

Très stable ($\sim 500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), elle relie les atomes au sein des molécules par mise en commun d'électrons (2 en cas de liaison simple, 4 en cas de liaison double) = **doublet liant**.

PROPRIÉTÉS DES LIAISONS COVALENTES

- **Distance faible** entre les deux atomes liés (les atomes se trouvent à une distance correspondant à la somme de leurs *rayons atomiques*).
- **Forte énergie de liaison** : coûteuses à fabriquer, difficiles à rompre.
- **Fortement directionnelles** : elles imposent des angles et des positions définies dans l'espace (de par les gênes stériques des atomes mis en liaison), et conditionnent par conséquent la *configuration* d'une molécule.
- **Stables en conditions cellulaires** : elles ne sont en général créées et rompues que par des réactions catalysées par des enzymes.

Lorsque deux atomes présentant des électronégativités très différentes sont liés l'un à l'autre, les électrons de liaisons sont plus attirés par l'atome le plus électronégatif : la **liaison est alors polarisée**, les atomes impliqués portent des charges partielles positives (δ^+) ou négatives (δ^-). Les deux charges opposées partielles forment un **dipôle électrique**, qui peut être **permanent** ou **induit**.

Parmi les éléments courants chez les êtres vivants, l'oxygène est le plus fortement électronégatif. Ainsi, les doubles liaisons $\text{C}=\text{O}$ sont les plus polarisées.

Liaison (covalente) de coordination

Liaison covalente dans laquelle les deux électrons partagés proviennent du même atome (donc pas de « mise en commun » de deux électrons).

« Liaisons » faibles = interactions non covalentes

Relativement instables (de 2 à 50 kJ · mol⁻¹), les « liaisons » faibles interviennent dans la conformation des molécules, les interactions inter-moléculaires et les structures dynamiques.

Ce ne sont pas de vraies « liaisons » : il convient mieux de parler d'*interactions* ou de *forces*.

PROPRIÉTÉS DES « LIAISONS » FAIBLES

- **Distance plus grande** entre les deux atomes (les couches électroniques sont séparées).
- **Faible énergie de liaison** (20 à 100 fois moins que la covalente).
- **Plus ou moins directionnelles**.
- **Plus ou moins stables en conditions cellulaires** : leur stabilité dépend surtout de leur nombre et elles sont facilement réversibles.

Liaison ionique = interaction électrostatique	• Entre des groupes ionisés : atomes présentant une forte différence d'électronégativité. • Échange (<i>mais pas de mise en commun</i>) d'un électron (ou plus) de l'atome le moins électronégatif vers le plus électronégatif. • Non directionnelle : les charges électriques sont régulièrement réparties autour des atomes. • Ex : attraction entre COO^- et NH_3^+, répulsion entre phosphates, cohésion d'un cristal de sel (NaCl)... • L'ionisation des groupes dépend du pH cellulaire : elle peut donc être modifiée en fonction du pH.
Liaison H = interaction hydrogène	• Entre un atome d'hydrogène engagée dans une liaison covalente polarisée (porteur d'une charge partielle δ^+) et un atome électronégatif (généralement O ou N), lui aussi engagé dans une liaison covalente polarisée (porteur d'une charge partielle δ^-). • « Partage » d'un H entre le donneur et l'accepteur : « pont hydrogène ». • Directionnelle : plus forte quand les trois atomes sont alignés (donneur de H/H/accepteur de H). • Non permanente, c'est-à-dire très labile : faible durée de vie.

Force de Van der Waals (VdW)	• Liaison de type électrostatique entre dipôles opposés, permanents ou induits provoqués par la distribution asymétrique des électrons autour du noyau atomique : attraction des atomes jusqu'à une certaine distance, sans chevauchement des nuages électroniques (donc pas de mise en commun d'e⁻). • Représente l'attraction électrostatique entre le noyau d'un atome et les électrons d'un autre atome • Les atomes sont en « contact de Van der Waals » : cela impose une certaine distance (rayon de VdW). • Non spécifique : concerne tous les atomes dès lors qu'ils sont à 3-4 Å l'un de l'autre.
Interaction hydrophobe	• Interaction qui ne peut être envisagée qu'en rapport avec les propriétés de solvant de l'eau vis-à-vis des molécules hydrophobes ou apolaires : l'eau contraint les résidus hydrophobes à se regrouper pour minimiser leur contact avec l'eau (provoquant des ruptures sur le réseau des liaisons H entre molécules d'eau) → minimisation de l'énergie du système. • Les molécules hydrophobes sont alors maintenues ensemble par des « interactions hydrophobes » (qui sont en fait des forces de Van Der Waals entre dipôles transitoires), même si leur attraction se fait en réalité « par défaut », résultant d'une répulsion de l'eau et de l'impossibilité pour ces molécules d'établir des liaisons H avec l'eau.

■ Importance biologique des « liaisons » faibles

Par un **effet cumulatif dû à leur répétition**, ce sont les interactions faibles qui donnent aux molécules complexes leur cohésion dans une **forme spatiale spécifique** (*conformation*) et **souvent malléable** :

- « liaisons » H : structure stable de l'ADN avec dénaturation possible (et nécessaire pour la réplication, la transcription, la réparation...), structures secondaires des protéines... ;
- forces de VdW et interactions hydrophobes : repliement des protéines, formation des bicouches lipidiques (membranes biologiques)... ;
- interactions ioniques : activation d'enzymes (ex : protéase à sérine active).

Cette **conformation** est **indispensable à l'expression de leur fonction** : son altération par la rupture de l'ensemble des liaisons faibles se traduit par la perte de la fonction. La molécule est alors **dénaturée** (ex : protéines, ADN...).

Au contraire des liaisons covalentes, ces différentes interactions faibles (toutes catégories confondues) offrent la possibilité d'**interactions réversibles** : elles assurent les **associations moléculaires temporaires et dynamiques** indispensables aux phénomènes biologiques de reconnaissance (ex : hormone/récepteur, antigène/anticorps...) ou de catalyse (ex : enzyme/substrat).

Le fonctionnement des systèmes biologiques implique donc à la fois :

- des **liaisons fortes** $\Leftrightarrow$ **structure stable** des molécules ;
- des **liaisons faibles** $\Leftrightarrow$ **structure dynamique** des molécules.

UTILISER LE VOCABULAIRE ADAPTÉ

« **Dégrader** » une molécule : détruire sa configuration = casser des liaisons covalentes (par exemple par hydrolyse, réaction redox...).

« **Dénaturer** » une molécule : détruire sa conformation = casser des liaisons faibles (par exemple par chauffage modéré, modification pH, FI...).

Bilan : caractéristiques des liaisons et interactions

	Covalente	Ionique	H	VdW	Hydrophobe
Mise en commun d'e ⁻	✓	✗	✗	✗	✗
Énergie [kJ · mol ⁻¹]	500 (200-900)	50 (20-100)	20 (1-40)	2 (1-10)	10 (5-15)
Distance [pm]	100-150	250-300	150-200*	300-500**	~ 200
Directionnelle	✓ fortement	✗	✓ fortement	✗	✗

* entre le H et l'accepteur d'H, mais 300-400 pm entre le donneur et l'accepteur de H.

** la distance optimale dépend des atomes (rayon de VdW) mais est supérieure à la distance d'une liaison covalente.

2. Quelques propriétés des solutions

■ Pression osmotique π

C'est la force exercée par une solution mise en présence du solvant pur (l'eau) duquel elle est séparée par une membrane semi-perméable (laissant passer l'eau mais pas les solutés) : elle est **proportionnelle à la concentration des solutés**.

En s'inspirant de la loi des gaz parfaits, Van t'Hoff (1886) établit une formule de calcul pour une solution peu concentrée :

$$\pi = R \cdot T \cdot \sum c$$

π : pression osmotique de la solution en Pa (1 Pa = 1 N · m⁻²).

$\sum c$: somme des concentrations molaires des espèces en solution en mol · m⁻³, **tenant compte de l'ensemble des espèces présentes en solution**.

R : constante des gaz parfaits = 8,31 J · K⁻¹ · mol⁻¹ (1 J = 1 N · m).

T : température absolue en K.

NB 1 : potentiel osmotique = $\Psi_O = -\pi$.

NB 2 : le potentiel osmotique est une composante du **potentiel hydrique Ψ** , qui gouverne les mouvements de l'eau (*elle se déplace selon les potentiels hydriques décroissants*) :

$$\Psi = \Psi_H + \Psi_O + \Psi_m = \Psi_P - \pi$$

(avec Ψ_H = potentiel hydrostatique ; Ψ_m = potentiel matriciel ≈ 0).

Dans un liquide biologique, une part non négligeable de la pression osmotique est due à la pression exercée par les seules protéines = **pression oncotique**.

Pour une cellule présente dans un milieu liquide, celui-ci est avant tout caractérisé par sa pression osmotique (**hypo-**, **iso-** ou **hypertonique**). Dans ce cas, l'osmose ne concerne que l'eau.

Force ionique (FI)

Elle dépend de la concentration et de la charge des espèces en solution. Pour les solutions aqueuses peu concentrées :

$$FI = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot z_i^2$$

FI : force ionique en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

c_i : concentration molaire de l'ion i .

z_i : charge de l'ion i .

La FI conditionne les équilibres de dissociation des sels, et surtout la **solubilité et la mobilité des protéines en solution** (précipitations cf. fiche 18, chromatographies cf. fiche 22, électrophorèses cf. fiche 26). Elle est également très importante dans la **constitution des tampons** utilisés en biochimie.

EXEMPLE

FI d'une solution $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de chlorure de calcium.

On a : $\text{CaCl}_2 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + 2 \text{Cl}^-$.

D'où : $FI = 0,5 \times (0,01 \times 2^2 + 0,02 \times 1^2) = 0,03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Pouvoir tampon (PT)

C'est la capacité d'une solution à **conserver une valeur stable de pH** (empêche ou limite les variations de pH) lorsque des acides ou des bases lui sont ajoutés. En première approche simplificatrice, le pouvoir tampon est évalué par :

$$PT = \frac{\Delta V}{\Delta \text{pH}}$$

ΔV : variation perturbatrice (ajout d'un volume d'acide ou de base).

ΔpH : variation de pH engendrée.

Les systèmes tampons sont des solutions contenant en concentrations voisines un acide faible (**AH**) et le sel de sa base forte conjuguée (**A⁻**), ou une base faible (**B**) et son sel d'acide fort conjugué (**BH⁺**). Parmi les sels minéraux, deux systèmes tampons participent généralement au maintien du pH des milieux liquidiens :

Système	Localisation	Équation
Hydrogéo-carbonates* $pK_a = 6,3$	Liquides extracellulaires (liquide interstitiel, plasma)	$H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3$ $\rightleftharpoons H_2O + CO_2$
Phosphates** $pK_a = 7,3$	Liquide intracellulaire (cytosol)	$H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+$

* Ce tampon est aussi celui utilisé dans les systèmes de culture cellulaire pour cellules eucaryotes, en équilibre avec l'atmosphère à 5 % de CO_2 (cf. fiche 2). D'autres tampons sont aussi utilisés, comme le tampon HEPES.

** Ce tampon est aussi souvent utilisé dans les milieux de culture microbiens.

SYSTÈME TAMPON CO_2 /HYDROGÉNOCARBONATE

Le système **CO_2 /hydrogénocarbonate** est un tampon naturel du sang et du liquide interstitiel (mais pas le seul). Malgré leur pK_a de 6,30, les hydrogéo-carbonates sont efficaces car ils sont fortement concentrés dans le sang et le CO_2 s'échange avec l'atmosphère : on parle de système tampon « ouvert ».

En culture cellulaire, le CO_2 de l'atmosphère de culture se dissout partiellement dans l'eau du milieu pour former un acide et un couple tampon, selon l'équilibre suivant :



Rappel : équation d'Henderson-Hasselbach appliquée au couple ci-dessus

$$pH = pK_a + \log \frac{[BASE]}{[ACIDE]} = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$