

La PCR

Un procédé
de répllication
in vitro

D. LARZUL



lausier
TEC
DOC

EM
inter



COLLECTION

GÉNIE GÉNÉTIQUE G2

Sous la direction
de G. Lucotte.

Cette collection a pour objectif de fournir une panoplie complète des aspects technologiques récents utilisés dans le domaine en plein essor du génie génétique.

Une vingtaine de volumes sont prévus, ils ont été confiés à des spécialistes du monde de la recherche dans l'objectif de concevoir des outils pratiques présentant les nombreuses applications de cette nouvelle science, tout particulièrement dans le secteur médical.

La "Polymerase Chain Reaction" ou PCR est l'une des techniques les plus innovantes de la biologie moléculaire et ouvre de larges horizons à l'investigation génétique. Grâce à ses performances extrêmes, elle consacre de nouveaux concepts technologiques aujourd'hui reconnus comme méthodes de références.

Concrétisant les travaux de 120 chercheurs exerçant dans le monde entier, cet ouvrage rend compte de la richesse des informations actuellement disponibles dans ce domaine. Il constitue avant tout un outil pratique pour le biologiste et permet une initiation rapide : il présente en détail l'ensemble des technologies PCR, la protection industrielle de la méthode et les différentes applications notamment dans les domaines de la Santé et de l'Environnement. Les protocoles des manipulations explicitées dans la première partie sont l'objet d'une annexe très précieuse pour l'opérateur.

LA PCR - Un procédé de réplication *in vitro* se veut un vecteur important pour le Développement à plus grande échelle de ces technologies qui intéressent tous les secteurs liés aux sciences de la vie, de la médecine à l'agro-alimentaire...

Biologistes, généticiens, industriels, étudiants de 2^e et 3^e cycles... tous y puiseront les données indispensables pour aborder et maîtriser une dimension d'investigation prometteuse.

Comme l'explique François GROS dans la préface de cet ouvrage : la PCR préfigure déjà "une nouvelle biologie"...

2-85206-882-6



9 782852 06 8827

TABLE DES MATIÈRES

PREMIERE PARTIE

LES TECHNOLOGIES PCR

1 LA PCR : UN PROCÉDÉ D'AMPLIFICATION	23
1.1 La découverte de la PCR	23
D. LARZUL, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	
1.2 La présentation de la PCR	26
V. THIERS, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	
1.3 L'analyse par PCR quantitative	32
A.-C. SYVANEN, <i>National Public Health Institute, Helsinki, Finland</i>	
1.4 La «nested PCR » (nPCR)	39
L.-Z. XU, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	
2 LES APPROCHES EXPÉRIMENTALES	45
2.1 Les ADN polymérases thermostables	45
C. ELIE, <i>Institut de Génétique et de Microbiologie, Orsay, France</i>	
2.2 Le choix des amorces oligonucléotidiques en utilisant les critères thermodynamiques	50
C. BÉROUD, <i>INSERM U 73, Paris, France</i>	
2.3 Le choix des amorces oligonucléotidiques en utilisant les critères statistiques	56
P. JONES et M.J. BISHOP, <i>Medical Research Council, Cambridge, England</i>	
2.4 Le contrôle des contaminations par ampli-transfert	61
M.S. BERNINGER et J.L. HARTLEY, <i>Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA</i>	
2.5 Le clonage des produits PCR	65
S.G. RALPH, <i>Ludwig Institute for Cancer Research, Victoria, Australia</i>	

3	L'ANALYSE FINE D'UNE SÉQUENCE D'ACIDE NUCLÉIQUE	68
3.1	Le séquençage direct de l'ADN amplifié par une PCR asymétrique	68
	U.B. GYLLENSTEN, <i>University of Uppsala, Uppsala, Sweden</i>	
3.2	L'utilisation de la PCR et de la DGGE pour analyser un spectre de mutations ponctuelles	76
	P. KEOCHAVONG et W.G. THILLY, <i>University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA</i>	
3.3	La PCR et la SSCP	82
	T. SEKIYA, <i>National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan</i>	
3.4	L'analyse des mutations ponctuelles par modification chimique d'hétéroduplex d'ADN	87
	A. GANGULY et D.J. PROCKOP, <i>Jefferson Medical College, Philadelphia, USA</i>	
3.5	L'amplification spécifique d'allèle	94
	H. LI, <i>California Institute of Technology, Pasadena, USA</i>	
4	L'APPORT DE LA PCR POUR L'ANALYSE D'UN GÉNOME	100
4.1	La PCR et la cartographie du génome humain	100
	J. WEISSENBACH, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	
4.2	Les empreintes génétiques obtenues par PCR dans des conditions d'amorçage arbitraire : application aux levures de brasserie	113
	J. WELSH, R. WONG, D.N. ARVIDSON, C. GROVE ARVIDSON et M. MCCLELLAND, <i>California Institute of Biological Research, La Jolla, USA</i>	
5	L'AMPLIFICATION D'UNE SÉQUENCE INCONNUE	118
5.1	L'amplification d'une région inconnue par PCR ancrée	118
	P.N. MARCHE, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	
5.2	La marche par PCR sur un gène ciblé	124
	G.C. BURMER, <i>University of Washington, Seattle, USA</i>	
5.3	L'extension de séquences d'ADNc en utilisant la PCR et des séquences amorcées au hasard	129
	J.D. FRITZ, J.A. WOLFF et M.L. GREASER, <i>University of Wisconsin-Madison, Madison, USA</i>	
6	L'AMPLIFICATION DE SÉQUENCES PARTIELLEMENT CONNUES OU D'UNE FAMILLE DE SÉQUENCES CONNUES	133
6.1	Les amorces oligonucléotidiques dégénérées	133
	S.G. RALPH et A. WILKS, <i>Ludwig Institute for Cancer Research, Victoria, Australia</i>	
7	L'ANALYSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	140
7.1	La cytométrie en flux : le tri de chromosomes et la PCR	140
	G. FRELAT, B. CHAPUT et A. SCHMITZ, <i>CEA, Fontenay-aux-roses, France</i>	
7.2	La cytométrie en flux : le tri de cellules et la PCR	155
	S. HIROHASHI, <i>National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan</i>	

8 LA PCR EN TANT QUE MÉTHODE DE MODIFICATION	160
8.1 La mutagénèse par PCR	160
T.J. YUN et L.R. PEASE, <i>Mayo Clinic, Rochester, USA</i>	
8.2 La recombinaison homologue et les souris chimères	171
A. MANSOURI et P. GRUSS, <i>Max Planck Institute, Göttingen, FRG</i>	

DEUXIEME PARTIE

LA PROTECTION INDUSTRIELLE DE LA PCR

1 LA PROTECTION DE LA PCR	177
1.1 La protection par brevet de la méthode PCR. Problèmes relatifs aux brevets de large étendue de protection dans le domaine du génie génétique	
C. JUPIN, <i>Institut National de la Propriété Industrielle, Paris, France</i>	
2 LA PROTECTION DES SÉQUENCES D'ACIDE NUCLÉIQUE	189
2.1 La protection industrielle des séquences d'acide nucléique	
A. DESAIX, <i>Cabinet Gutmann, Paris, France</i>	
3 LES PROBLÈMES D'ÉTHIQUES	197
3.1 La recherche sur le génome humain : existe-t-il une hiérarchie des conséquences éthiques ?	
A. POMPIDOU, <i>Hôpital Cochin — Port-Royal</i>	

TROISIEME PARTIE

LES APPLICATIONS DE LA PCR

1 PCR ET VIROLOGIE	203
1.1 L'utilisation de la PCR pour le diagnostic des hépatites B, C et D	203
C. BRÉCHOT, <i>Hôpital Necker, Paris, France</i>	
1.2 L'application de la PCR à l'étude du virus de l'immuno-déficience humaine (VIH)	229
H. AGUT, <i>Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France</i>	

1.3 L'application de la PCR à l'étude des herpesviridae	237
F. MORINET, C. SCIEUX, J. LEJUNTER et M.-C. THEBAULT, <i>Hôpital Saint-Louis, Paris, France</i>	
1.4 Quelques études récentes	244
1.4.1 S. KANEKO, S. MURAKAMI, M. UNOURA, N. HATTORI et K. KOBAYASHI, <i>Kanazawa University, Kanazawa, Japan</i> • 1.4.2 J. BUKH, R.H. MILLER et R.H. PURCELL, <i>National Institutes of Health, Bethesda, USA</i> • 1.4.3 P. MARCELLIN, M. MARTINOT-PEIGNOUX, N. BOYER, M. POUTEAU, S. ERLINGER et J.-P. BENHAMOU, <i>Hôpital Beaujon, Clichy, France</i>	
2 PCR ET BACTÉRIOLOGIE	251
2.1 Les applications médicales de la PCR	251
X. DE LAMBALLERIE, C. BOLLET et P. DE MICCO <i>Hôpital Salvator, Marseille, France</i>	
2.2 La PCR appliquée à l'étude des bactéries du sol	262
X. NESME, P. SIMONET, L. JOCTEUR-MONTROZIER et P. NORMAND <i>Université Lyon I et INRA, Villeurbanne, France</i>	
2.3 Quelques études récentes	273
2.3.1 V. SHYAMALA et G. FERRO-LUZZI AMES, <i>Chiron Corporation, Emeryville, USA</i> • 2.3.2 K. NELSON, V. KAPUR, R.K. SELANDER et J.M. MUSSER, <i>Pennsylvania State University, USA</i> • 2.3.3 K. NELSON, J. LI et R.K. SELANDER, <i>Pennsylvania State University, USA</i> • 2.3.4 B.W. BREN et S. TABAQCHALI, <i>Bartholomew's Hospital Medical College, London, UK</i> • 2.3.5 T.D. BASSET, E.G. GORMLEY et A. MURRAY, <i>Massey University, Palmerston, New Zealand</i>	
3 PCR ET ONCOLOGIE	281
3.1 L'utilisation de la PCR en hématologie maligne	281
F. SIGAUX, <i>Hôpital Saint-Louis, Paris, France</i>	
3.2 L'analyse des tumeurs solides par PCR	290
K. ISONO, S. KABAYASHI et Y. ITO, <i>National Center Research Institute, Tokyo, Japan</i>	
3.3 Quelques études récentes	296
3.3.1 S. RODENHUIS, B. TOP, L. BOERRIGTER, R.J.C. SLEBOS, N. VAN ZANDWIJK et W.J. MOOI, <i>The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands</i> • 3.3.2 I.B. RENNEBAUM et S. SUKUMAR, <i>Salk Institute, San Diego, USA</i> • 3.3.3 M. GOTTELAND et E. MAY, <i>IRSC, Villejuif, France</i> • 3.3.4 B. PERBAL et A. SUREAU, <i>Institut Curie, Orsay, France</i> • 3.3.5 M.-S. LEE, <i>Anderson Cancer Center, Texas, USA</i> • 3.3.6 U. MOLL, <i>Princeton University, Princeton, USA</i>	
4 PCR ET MALADIES GÉNÉTIQUES	309
4.1 La PCR et le diagnostic des maladies génétiques	309
M. DELPECH, <i>Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, France</i>	
4.2 Quelques études récentes	320
4.2.1 M.-R. KENEALY et M. MONK, <i>Medical Research Council, London, UK</i> • 4.2.2 M. GRANT, M. ZUCCOTI et M. MONK, <i>Medical Research Council, London, England</i> • 4.2.3 H. FURUYA, <i>National Cancer Institute, Bethesda, USA</i> • 4.2.4 G. LUCOTTE, <i>Cochin-Port-Royal, Paris, France</i>	
5 LES AUTRES DOMAINES D'APPLICATION DE LA PCR	33
5.1 L'utilisation de la PCR pour le typage HLA	33
N. COHEN et J. DAUSSET, <i>CEPH, Paris, France</i>	

5.2 Les champignons et la PCR	335
I. MOUYNÉ et Y. BRYGOO, <i>Université Paris Sud, Orsay, France</i>	
5.3 La PCR et les parasites	342
J. DUPOUY-CAMET, <i>Hôpital Cochin, Paris, France</i>	
5.4 La PCR en criminologie	346
B. BRINKMANN, <i>Münster University, Münster, FRG</i>	
5.5 La PCR sur les régions intergéniques ARNt des bactéries : méthode de diagnostic et classification des espèces bactériennes	352
J. WELSH, C. PETERSEN et M. MC CLELLAND, <i>California Institute of Biological Research, La Jolla, USA</i>	
5.6 Quelques études récentes	356
5.6.1 K. HSIAO et S.B. PRUSINER, <i>University of California, San Francisco, USA</i> • 5.6.2 B. TOP, <i>The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands</i> • 5.6.3 J.-M. COSTA et M. VIDAUD, <i>Faculté de Pharmacie, Paris, France</i>	

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

D. LARZUL, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>	363
---	-----

ANNEXE

1 Protocole de « nested PCR » en un tube unique	374
L.-Z. XU Partie 1, 1.4	
2 Protocole de séquençage direct par PCR asymétrique utilisant la T7 et la Taq DNA polymérase	375
U.B. GYLLENSTEN Partie 1, 3.1	
3 Protocole de marche sur un gène par PCR	377
G.C. BURMER Partie 1, 5.2	
4 Protocole de 3' extension d'ADN_c en utilisant la PCR et des séquences amorcées au hasard	379
J.D. FRITZ, J.A. WOLFF et M.L. GREASER Partie 1, 5.3	
5 Protocole de PARM-PCR sur chromosomes triés	381
D. MILAN, M. YERLE et J. GELLIN Partie 1, 7.1	
6 Protocole d'extension par recouvrement (SOE)	383
T.J. YUN et L.R. PEASE Partie 1, 8.1	
7 Protocole de criblage par PCR pour la recombinaison homologue	385
A. MANSOURI et P. GRUSS Partie 1, 8.2	

INDEX DES MOTS CLÉS