

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 messager	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

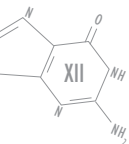
3.1	Enzymes de restriction	29
3.1.1	Origine	29
3.1.2	Utilité	30
3.1.3	Mode de fonctionnement	30
3.1.4	Sites de reconnaissance	30
3.2	Digestion de l'ADN	31
3.2.1	Digestion partielle et activité étoile	32
3.3	Autres enzymes de modification de l'ADN	33
3.3.1	Remplissage ou digestion des extrémités saillantes	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
-----	------------	----



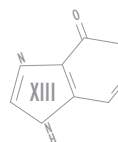
5.2	Plasmides	49
5.3	Vecteurs de clonage	49
5.3.1	Composantes de base	50
5.3.1.1	Origine de réplication (ori)	50
5.3.1.2	Gène de sélection	51
5.3.1.3	Site de clonage multiple	51
5.3.2	Composantes facultatives	51
5.3.2.1	Marqueur de criblage	52
5.3.2.2	Promoteur et terminateur de transcription	52
5.3.2.3	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**

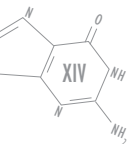
7.1	Transformation d'une bactérie par un plasmide	78
7.1.1	Définition de la transformation	78
7.1.1.1	Transformation par la chaleur	79
7.1.1.2	Électroporation	79



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

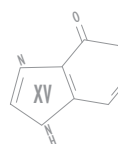
8.1	Cartes de restriction.....	103
8.2	Étapes d'un clonage moléculaire.....	106
8.2.1	Élaboration d'une stratégie de clonage.....	106
8.2.1.1	Choix du vecteur et de l'insert.....	106
8.2.1.2	Choix des sites de restriction.....	108
	A. Si possible, choisir des sites de restriction cohésifs entre eux.....	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



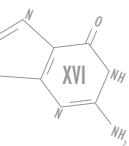
8.2.11	Identification des clones contenant la construction recherchée.....	122
8.2.12	Entreposage des transformants intéressants.....	124
8.3	Protocoles.....	124
8.3.1	Précipitation de l'ADN.....	124
8.3.1.1	Préparation des solutions.....	125
8.3.1.2	Précipitation de l'ADN.....	125
8.3.2	Extraction d'ADN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

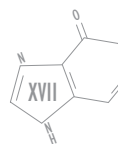
9.1	Principe du PCR.....	133
9.1.1	Dénaturation de l'ADN.....	135
9.1.2	Hybridation des amorces.....	135
9.1.3	Polymérisation.....	135
9.1.4	Production d'un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN grâce à l'enchaînement de plusieurs cycles.....	136
9.2	Température de fusion (T_m) d'un fragment d'ADN.....	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 <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



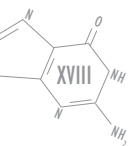
	A. Anomalies de nombre	186
	B. Anomalies de structure	187
12.2.2	Hybridation <i>in situ</i>	187
12.2.2.1	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence (FISH)	188
12.2.2.2	Hybridation génomique comparative (CGH)	189
12.2.2.3	Peinture chromosomique	190
12.2.2.4	Élongation d'amorce <i>in situ</i> (PRINS)	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

Chapitre 14 – Analyse des protéines 217

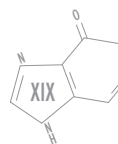
14.1	Extraction des protéines	217
14.2	Purification des protéines	218
14.2.1	Précipitation différentielle des protéines	218
14.2.2	Chromatographie sur colonne	219
14.2.3	Stabilité des protéines	220
14.3	Dosage des protéines	221
14.3.1	Méthode spectrophotométrique	221
14.3.2	Méthodes colorimétriques	222
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



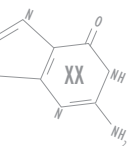
14.11.3.1	Préparation des solutions	241
14.11.3.2	Coloration du gel	242
14.11.4	Buvardage à la western	242
14.11.4.1	Préparation des solutions	243
14.11.4.2	Transfert des protéines	244
14.11.4.3	Blocage de la membrane	245
14.11.4.4	Incubation avec les anticorps et lavages	245
14.11.4.5	Révélation	245
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>FMR1</i> par buvardage à la Southern	252
	B. Méthode d'analyse du gène <i>FMR1</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 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>FMRI</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



Liste des tableaux

Tableau 1.1	Structure des composantes des acides nucléiques	5
Tableau 1.2	Principales différences entre procaryotes et eucaryotes	10
Tableau 1.3	Différences entre la mitose et la méiose	14
Tableau 2.1	Code génétique	24
Tableau 3.1	Quelques enzymes de restriction communes et leur site de reconnaissance	32
Tableau 3.2	Exemple d'une réaction de digestion avec une enzyme de restriction	33
Tableau 3.3	Enzymes de modification de l'ADN à utiliser selon le besoin	33
Tableau 7.1	Principaux antibiotiques et concentrations suggérées	82
Tableau 7.2	Types de préparations d'ADN plasmidique	83
Tableau 7.3	Principales étiquettes utilisées pour la purification de protéines	88
Tableau 8.1	Exemple d'une réaction de ligation	119
Tableau 9.1	Quantité d'ADN matrice à utiliser pour une réaction de PCR selon la source de l'ADN	138
Tableau 9.2	Efficacité de coupure de quelques enzymes de restriction sur des extrémités d'ADN	142
Tableau 10.1	Équivalence entre les unités de radioactivité	160
Tableau 14.1	Pourcentage de polyacrylamide requis selon la taille des protéines à séparer	224
Tableau annexe-II.1	Tableau périodique des éléments chimiques	300

Liste des figures

Figure 0.1	De la biologie générale à la biologie moléculaire	1
Figure 1.1	Structure d'un nucléotide	4
Figure 1.2	Structure du pentose de l'ADN et de l'ARN	6
Figure 1.3	Structure de l'ADN	7
Figure 1.4	Niveaux de compaction de la chromatine	9
Figure 1.5	Schéma d'un cycle cellulaire typique	11
Figure 1.6	Mitose	12
Figure 1.7	Méiose	13
Figure 2.1	Réplication de l'ADN	18
Figure 2.2	Réplication semi-conservative	19
Figure 2.3	Schéma d'un gène et des éléments nécessaires à la transcription	21
Figure 2.4	Maturation d'un ARNm	23
Figure 2.5	ARNt et principales étapes de la traduction	25
Figure 2.6	Hémoglobine	27
Figure 3.1	Digestion par des enzymes de restriction	31
Figure 3.2	Remplissage ou digestion des extrémités saillantes	34
Figure 3.3	Réaction catalysée par la polynucléotide kinase du phage T4	35
Figure 4.1	Transmission des caractères dominants et récessifs : expérience de monohybridisme de Mendel	39
Figure 4.2	Mutations chromosomiques et ponctuelles	41
Figure 4.3	Types de mutations transmissibles chez les humains	43
Figure 4.4	Exemple de RFLP	45
Figure 5.1	Exemple du clonage du gène de l'insuline	48
Figure 5.2	Présence de plasmides à l'état naturel chez plusieurs bactéries	49
Figure 5.3	Exemple d'un vecteur de clonage : pUC19	50

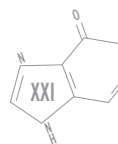


Figure 5.4	Exemple d'un site de clonage multiple	51
Figure 5.5	Exemple d'un criblage à l'aide du gène <i>lacZ</i>	53
Figure 5.6	Exemple de vecteur navette bactérie-levure	54
Figure 6.1	Exemple d'appareil de migration pour l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose	58
Figure 6.2	Exemple d'un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium	60
Figure 6.3	Concentration d'agarose à utiliser selon la taille des fragments d'ADN à séparer	61
Figure 6.4	Exemple de graphique pour déterminer la taille d'un fragment d'ADN	61
Figure 6.5	Exemple de calcul de concentration d'ADN	65
Figure 6.6	Exemple d'appareil de migration pour l'électrophorèse de l'ADN sur gel de polyacrylamide	66
Figure 6.7	Pouvoir de résolution des gels de polyacrylamide	67
Figure 7.1	Schéma d'une transformation	78
Figure 7.2	Différence entre sélection et criblage	81
Figure 7.3	Mini-préparation d'ADN plasmidique	85
Figure 7.4	Exemple de surexpression et de purification d'une protéine	87
Figure 8.1	Cartes de restriction	104
Figure 8.2	Exemples de vecteurs de clonage	107
Figure 8.3	Extrémités saillantes et cohésives	109
Figure 8.4	Différentes possibilités d'introduction d'un insert dans un vecteur selon les extrémités créées par la digestion	111
Figure 8.5	Purification sur gel d'un fragment d'ADN digéré	116
Figure 8.6	Déphosphorylation du vecteur digéré	118
Figure 8.7	Exemple de calcul pour respecter le ratio d'une molécule de vecteur pour cinq molécules d'insert	120
Figure 8.8	Exemple d'une confirmation de clonage	123
Figure 9.1	Schéma représentant quatre cycles d'une réaction de PCR	134
Figure 9.2	T_m d'un fragment d'ADN	137
Figure 9.3	Ajust de séquences dans un fragment d'ADN amplifié par PCR	141
Figure 9.4	Clonage d'un fragment de PCR dans un vecteur T	143
Figure 9.5	Le LM-PCR	144
Figure 9.6	Phases d'un PCR	146
Figure 9.7	Méthodes de détection de l'ADN amplifié	147
Figure 10.1	Sondes nucléiques	157
Figure 10.2	Marquage aléatoire	161
Figure 10.3	Marquage par remplissage d'une extrémité 5' saillante	162
Figure 10.4	Marquage par la polymérase à ADN du phage T4	163
Figure 10.5	Marquage d'un ARN par transcription <i>in vitro</i>	164
Figure 10.6	Exemple de chimiluminescence	166
Figure 11.1	Séquençage selon la méthode de Sanger	173
Figure 12.1	Détection de l'anémie falciforme par buvardage à la Southern	181
Figure 12.2	Buvardage à la Southern	183
Figure 12.3	Position du centromère sur un chromosome	185
Figure 12.4	Caryotypes humains	186
Figure 12.5	Détection des sondes marquées	188
Figure 12.6	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence (FISH)	189

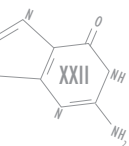


Figure 13.1	Puce à ADN.....	210
Figure 14.1	Exemples de chromatographie.....	220
Figure 14.2	Électrophorèse des protéines sur gel de SDS-polyacrylamide.....	223
Figure 14.3	Électrophorèse de protéines en deux dimensions.....	225
Figure 14.4	Buvardage à la western.....	227
Figure 14.5	Coimmunoprécipitation.....	229
Figure 14.6	Système double hybride chez la levure.....	231
Figure 14.7	Retardement sur gel.....	232
Figure 14.8	Immunoprécipitation de la chromatine.....	233
Figure 15.1	Analyse moléculaire du gène <i>HFE</i> pour la présence de la mutation C282Y par analyse des sites de restriction.....	251
Figure 15.2	Analyse du gène <i>FMR1</i> par buvardage à la Southern.....	253
Figure 15.3	Chromosome de Philadelphie.....	256
Figure 15.4	Principe de la méthode diagnostique de la trousse <i>Amplicor</i> TM (test CT/NG).....	261
Figure 15.5	Analyse de SNP par microséquençage.....	264
Figure 16.1	Détection de la mutation C282Y par PCR allèle spécifique.....	269
Figure 16.2	Déroulement des étapes du diagnostic moléculaire de la leucémie myéloïde chronique.....	272
Figure 17.1	Construction plasmidique.....	283