

TABLE DES MATIÈRES

Avant Propos

Chapitre I : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET MEDECINE : UN PANORAMA

I.1 Les étapes d'une révolution méthodologique	p.1
I.2 Les applications : La Nouvelle Génétique	p.6

Chapitre II : REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

II.1 L'organisation des gènes diffère chez les procaryotes et les eucaryotes	p.1
II.2 La régulation de la transcription chez les procaryotes	p.4
II.2.1 Régulation de l'opéron lactose chez E. coli. Induction (contrôle positif)	p.6
II.2.2 Régulation positive de l'opéron lac par la protéine CAP ou CRP et répression catabolique	p.10
II.2.3 L'opéron tryptophane : l'atténuation est une autre forme de régulation	p.14
II.3 Transcription chez les eucaryotes	p.17
II.3.1 Les promoteurs	p.18
II.3.2 Les éléments activateurs, amplificateurs ou "enhancers"	p.27
II.3.3 Les modules des promoteurs comme des enhancers sont des séquences consensus reconnues par des facteurs transcriptionnels	p.34
II.3.4 La régulation par le choix du promoteur	p.59
II.3.5 Utilisation de promoteurs alternatifs	p.60
II.3.6 Le génome humain contient de rares exemples de gènes chevauchants et de gènes dans les gènes	p.60
II. 4 Contrôle de l'activité de l'ADN chez les eucaryotes	p.62
II. 4.1 Méthylation et contrôle de l'activité de l'ADN	p.65
II. 4.2 Les sites sensibles à l'ADNase	p.66
II. 4.3 Les mécanismes du contrôle de la transcription	p.68

Chapitre III : PRINCIPAUX OUTILS ET TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

III. 1Préparation et analyse de l'ADN et de l'ARN	p.1
III.1.1 La préparation de l'ADN	p.1
III.1.2 Préparation des ARNs totaux	p.2
III.1.3 Préparation des ARNs poly A+	p.3
III.1.4 Les extraction et les précipitations	p.4
III.1.5 Le dosage des acides nucléiques	p.5
III.1.6 Séparation analytique et préparative de l'ADN	p.6
III.1.7 Ultracentrifugations	p.9

III.2 Les enzymes de restrictions		p10
III.2.1 Le phénomène de restriction	p.10	
III.2.2 Nomenclature des enzymes de restriction	p.12	
III.2.3 Les enzymes de restriction de type II	p.13	
III.2.4 Les méthylases de l'ADN bactérien	p.15	
III.3 Autres enzymes couramment utilisées en biologie moléculaire		p.16
III.3.1 Les polymérases d'acides nucléiques	p.16	
III.3.2 Les ligases	p.19	
III.3.3 Les nucléases	p.19	
III.3.4 Les RNases	p.20	
III.3.5 Les autres enzymes importantes	p.21	
III.4 Utilisation des enzymes de restriction : détermination des cartes de restriction		p.22
III.5 Cartographie des transcrits : recherche des sites d'initiation de la transcription		p.23
III.6 L'hybridation moléculaire		p.25
III.6.1 Notion de température de fusion de l'ADN	p.25	
III.6.2 Notion d'hybridation	p.28	
III.6.3 Hybridation en phase liquide	p.30	
III.6.4 Hybridation sur support solide	p.32	
III.6.5 L'hybridation in situ	p.33	
III.7 les sondes et leur marquage		p.33
III.8 Analyse du génome et de ses modifications		p.38
III.8.1 Le Southern blot : visualisation d'une portion du génome	p.38	
III.8.2 Le Northern blot : analyse qualitative des transcrits	p.42	

Chapitre IV : LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR QUANTITATIVE)
--

IV.1 La PCR est une méthode de clonage acellulaire de l'ADN		p.1
IV.1.1 Réaction de PCR standard	p.1	
IV.1.2 Caractéristiques de la PCR	p.14	
IV.2 Application de la PCR		p.16
IV.2.1 Source de l'ADN utilisé pour la PCR	p.16	
IV.2.2 Amplification des séquences spécifiques d'ADN humain	p.17	
IV.2.3 Analyses des polymorphismes et des mutations pathogènes	p.19	
IV.2.4 Le suivi des thérapies anticancéreuses	p.21	
IV.2.5 Détection des infections virales ou bactériennes	p.23	
IV.2.6 Clonage rapide d'ADNc par PCR et le clonage de membres non caractérisés de familles d'ADN		
IV.2.7 Amplification non discriminative de toutes les séquences d'ADN à partir d'une quantité infime d'ADN source	p.25	
IV.2.8 Séquençage de l'ADN par PCR asymétrique	p.26	
IV.2.9 Clonage cellulaire de l'ADN à partir de produits de PCR	p.28	

IV.2.10 La PCR et la mutagenèse dirigée	p.29	
IV.3 La RT-PCR		p.31
IV.3.1 Problème de la quantification liée à la technique RT-PCR (voir Travaux Pratiques)		p.33
IV.3.2 La PCR en temps réel « real time PCR »:	p.34	
ANNEXE AU CHAPITRE IV		p.38

Chapitre V: LES VECTEURS DE CLONAGE

V.1 Le concept de vecteur		p.1
V.2 Principes généraux d'utilisation d'un vecteur		p.7
V.3 Les plasmides		p.15
V.3.1 Sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide recombiné	p.16	
V.3.2 Les différents plasmides	p.17	
V.4 Les phages		p.21
V.4.1 Préparation d'un phage pour la construction d'un recombinant	p.24	
V.4.2 Préparation de l'ADN à introduire et construction de l'hybride	p.26	
V.4.3 Les différents phages utilisés en biologie moléculaire	p.31	
V.5 Les phagemides		p.37
V.6 Les cosmides		p.40
V.7 Les vecteurs navette		p.42
V.8 Les vecteurs viraux eucaryotes		p.42
V.9 Les chromosomes artificiels de levure : les YAC (Yeast Artificial Chromosomes)		p.42
TABLEAU V.1		p.44
ANNEXE: LES MARQUEURS BIOLOGIQUES		p.45

Chapitre VI : RECHERCHE D'UN NOUVEAU GENE PAR CRIBLAGE D'UNE BANQUE

VI.1 Les banques génomiques		p.1
VI.1.1 Etablissement de la banque	p.2	
VI.2 Les banques d'ADNc		p.4
VI.2.1 Le copiage enzymatique	p.5	
VI.2.2 Le choix du vecteur	p.8	
VI.3 Le criblage de la banque		p.9
VI.3.1 Le criblage avec une sonde qui reconnaît l'ADN	p.11	
VI.3.2 Le criblage avec une sonde qui reconnaît les protéines	p.17	
VI.3.3 Le criblage par complémentarité fonctionnelle	p.20	
VI.3.4 Identification de gènes spécifiques de certains tissus par hybridation différentielle		p.22
VI.3.5 Identification de gènes en utilisant des banques d'expression dans des phages		p.26
VI.3.6 Identification de gènes par le système de double hybride chez la levure		p.28

VI.4 Les séquences et les banques de données	p.30
VI.4.1 La comparaison avec les séquences des banques de données permet d'identifier les protéines et leur fonction	p.32
VI.4.2 La technique de "marche sur le chromosome" ("chromosome walking") est utilisée pour analyser de longues régions d'ADN eucaryotique	p.34
VI.5 Etude des protéines codées par les ADNc clonés	p.35

Chapitre VII : MUTAGENESE IN VITRO

VII Introduction : Mutagenèse aléatoire et mutagenèse dirigée	p.1
VII.2 Mutagenèse aléatoire	p.4
VII.2.1 L'insertion d'adaptateurs	p.4
VII.2.2 Des délétions emboîtées	p.6
VII.2.3 La mutagenèse par balayage avec des oligonucléotides adaptateurs	p.9
VII.2.4 Les substitutions aléatoires de nucléotides produites par modification chimique de l'ADN	p.11
VII.2.5 Les substitutions aléatoires produites par incorporation incorrecte des nucléotides	p.13
VII.2.6 Banque d'ADNc muté de façon aléatoire : technique de présentation par un phage	p.14
VII.3 Mutagenèse dirigée	p.16
VII.3.1 Les oligonucléotides synthétiques et extension enzymatique d'une amorce	p.16
VII.3.2 Identification des clones mutants par hybridation et séquençage	p.20
VII.3.3 Les cassettes oligonucléotidiques	p.23
VII.3.4 La PCR révolutionne la mutagenèse	p.27

Chapitre VIII : LE TRANSFERT DE GENES DANS LES CELLULES EUCARYOTES ET LA THERAPIE GENIQUE

VIII.1 La sélection de cellules transfectées : les marqueurs de sélection	p.1
VIII.2 Transfert de gènes : méthodologie	p.8
VIII.2.1 Transfert de gènes à l'aide de macromolécules polycationiques	p.9
VIII.2.2 Transfert de gènes par co-précipitation au phosphate de calcium	p.9
VIII.2.3 Transfert de gènes par électroporation	p.13
VIII.2.4 Transfert de gènes par liposomes	p.15
VIII.2.5 Transfert de gènes au moyen du « canon à gènes »	p.16
VIII.2.6 Transfert de gènes au moyen de vecteurs viraux	p.16
VIII.3 Les vecteurs viraux	p.17
VIII.3.1 Intérêt des virus en recherche	p.17
VIII.3.2 Les virus des eucaryotes : pouvoir transformant et transfert de gènes	p.18
VIII.3.3 SV40 et polyome, deux papovirus à pouvoir transformant	p.19
VIII.3.4 Transfection par les vecteurs viraux dérivés de SV40	p.22
VIII.3.5 Les rétrovirus	p.27
VIII.3.6 Les Adeno-Associated Virus (AAV)	p.41

VIII.3.7 Les adénovirus	p.41
VIII.3.8 Les baculovirus	p.47

Chapitre IX : EXPRESSION DES GENES CLONES ET PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES

IX.1 Principes des vecteurs d'expression	p.1
IX.2 La production de protéines recombinantes par les bactéries	p.1
IX.2.1 Construction de vecteurs d'expression bactérien	p.2
IX.2.2 Principaux avantages et inconvénients de l'expression chez la bactérie	p.6
IX.2.3 Les problèmes rencontrés lors de la purification des protéines recombinantes	p.7
IX.2.4 Production de protéines hybrides clivables	p.14
IX.3 La production par les cellules eucaryotes	p.15
IX.3.1 Intérêt de l'expression dans des cellules eucaryotes	p.15
IX.3.2 Exemples de cellules eucaryotes utilisées	p.15
IX.3.3 Construction de vecteurs d'expression	p.17
IX.3.4 Exemples de production de protéines recombinantes par les cellules de mammifères	p.20
IX.4 ARN anti-sens utilisés pour éteindre l'expression de gène	p.22
IX.5 RNA interférence	p.24

Chapitre X : LA TRANSGENESE ET LE DEVELOPPEMENT DE MODELES ANIMAUX SPECIFIQUES DE PATHOLOGIE

X.1 Les gènes étrangers s'intègrent dans les chromosomes de l'animal receveur	p.1
X.1.1 Micro-injection dans le pronucléus	p.1
X.1.2 Injection de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées dans des blastocytes hôtes	p.5
X.2 On peut limiter l'expression d'un transgène à certains tissus : utilisation de promoteur tissu-spécifique	p.9
X.3 On peut induire l'expression du transgène : utilisation du promoteur inductible	p.11
X.4 Le ciblage de gène par recombinaison homologue dans les cellules ES	p.11
X.5 Contrôle spatio-temporel de l'apparition de mutation : les systèmes de recombinaison site-spécifique, notamment le système Cre-loxP	p.16
X.6 Intérêts et utilisations des souris transgéniques	p.21
X.6.1 Modèles murins de maladie humaine	p.21
X.6.2 Intérêt des souris « Knock-out »	p.23

Chapitre XI : LA GENOMIQUE

XI.1 Introduction	p.1
XI.2 La Génomique Structurale	p.3
XI.2.1 L'ADN hautement répétitif	p.6
A. ADN répété en tandem	p.7
B. ADN hautement répétitif dispersé	p.11
XI.2.2 L'ADN moyennement répétitif codant	p.12
XI.2.3 Organisation générale des gènes codant pour les protéines	p.14
XI.2.4 Résumé de l'organisation globale d'un chromosome eucaryote.	P.24
XI.2.5 Les éléments transposables : reconfiguration génétique	p.25
A. Procaryotes	p.25
B. Eucaryotes	p.29
XI.3 La génomique fonctionnelle	p.34
XI.3.1 La caractérisation du protéome grâce aux cadres de lecture ouverts.	p.34
XI 3.2 Le knock out des gènes	p.34
XI.3.3 L'étude des interactions de gènes par le système de levure dit « double hybride »	p.34
XI.3.4 L'étude de la régulation du développement à l'aide de puces à ADN	p.36

XII. Chapitre XII : Epissage de l'ARN messenger et contrôle post-transcriptionnel chez les eucaryotes

XII.1 Introduction	
XII.2 Mécanismes de l'épissage	p.5
XII.3 Epissage différentiel ou alternatif	p.13
XII.4 Epissage alternatif et polyadénylation alternative	p.17
XII.5 Contrôle post-transcriptionnel chez les eucaryotes : siRNA et miRNA	p.18