République Algérienne Démocratique et Populaire
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

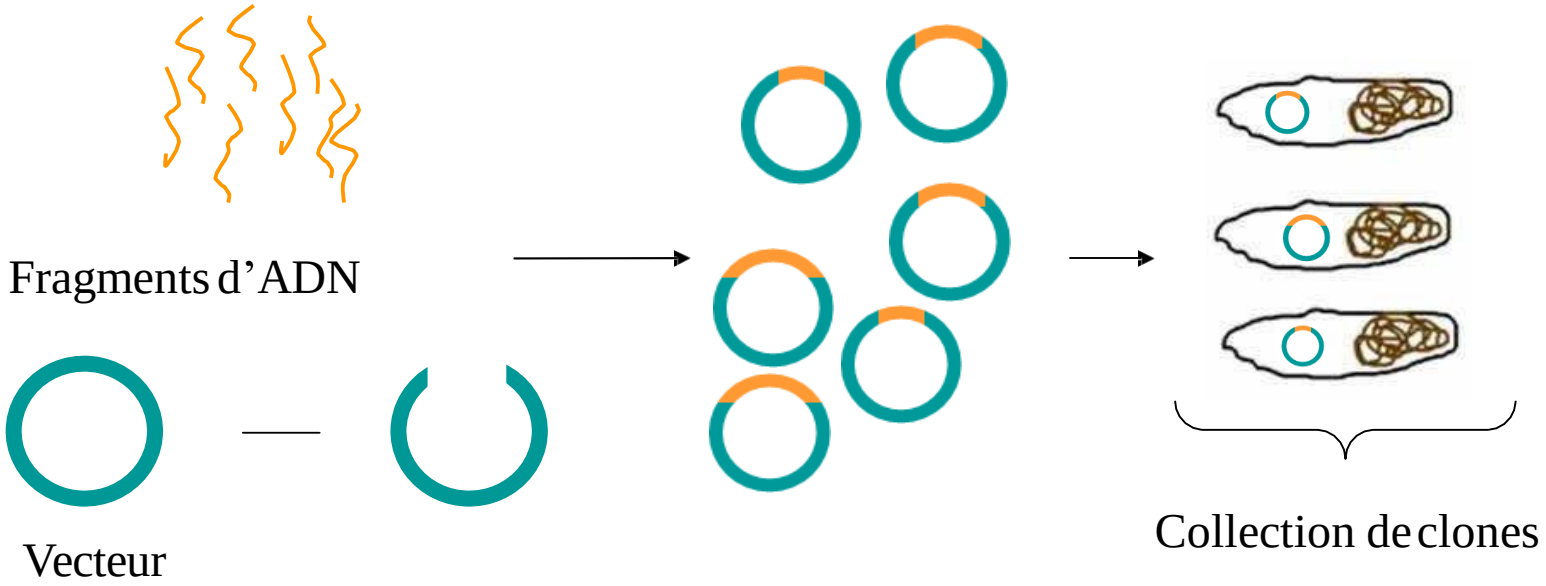
COURS 7:

LES BANQUES D'ADN ET SEQUENÇAGE

Dr ABDI Meriem
Génie génétique, Licence 3 Biochimie

DÉFINITION D'UNE BANQUE D'ADN

- Une banque d'ADN est un ensemble de larges fragments d'ADN d'un génome d'intérêt qui sont clonés dans un vecteur réplicatif (type plasmide) et introduit dans une cellule hôte facile à répliquer.



TYPES DE BANQUE D’ADN

On distingue deux type de banque ADN :

1. **Les banques d'ADN génomique :**

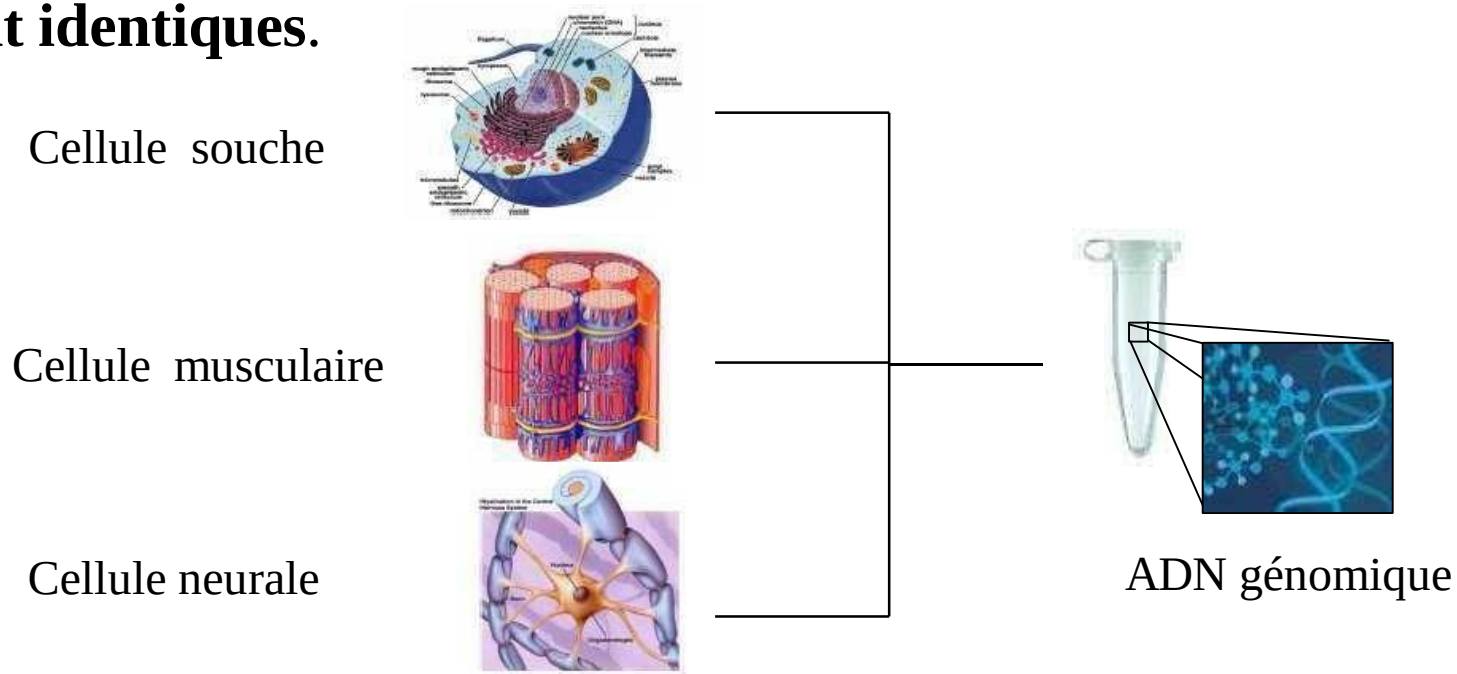
Collection de clones représentant la totalité du génome d’un organisme d’intérêt obtenue par **digestion partielle**, à l'aide d'une ou plusieurs enzymes de restriction, de l'ADN génomique.

1. **Les banques d’ADN complémentaire ou ADNc:**

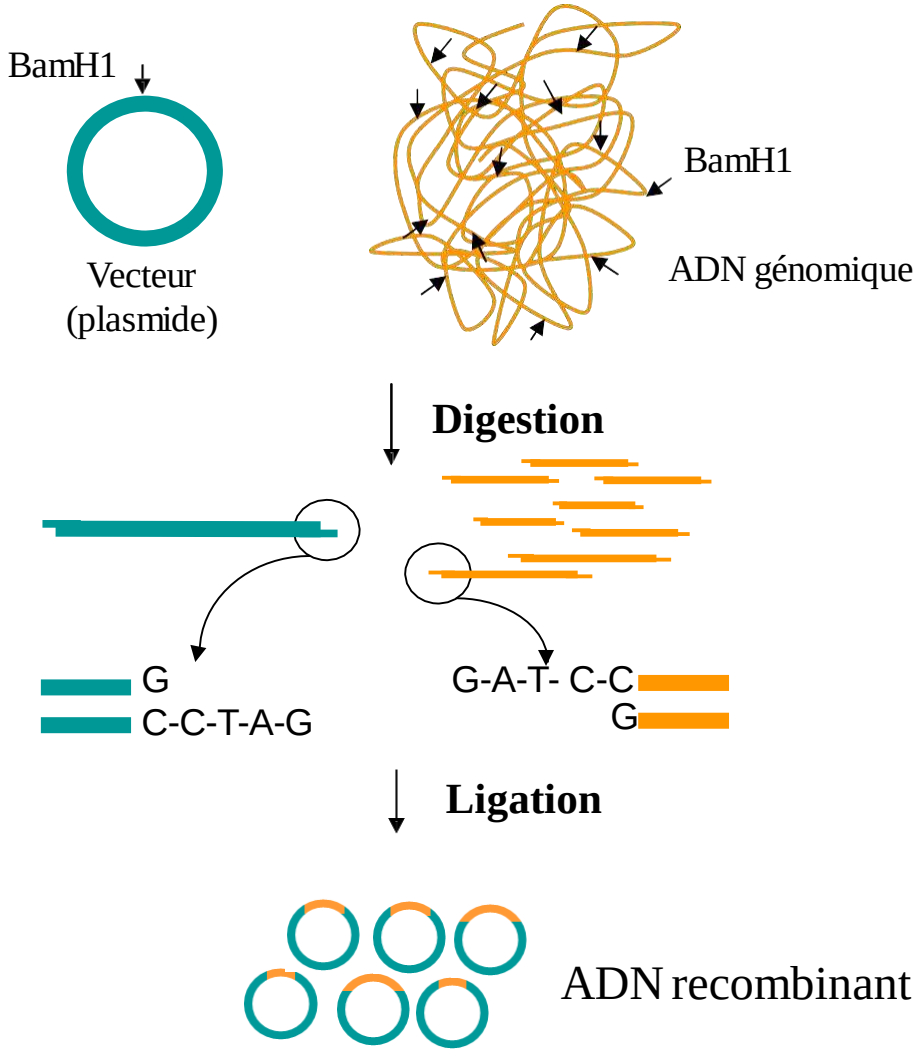
Collection de clones représentant l’ensemble des ARNm présent à un moment donné dans un tissu ou dans un organe donné.

BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE

- Dans une banque d'ADN génomique, l'ADN cloné est **l'ADN chromosomique.**
- L'ADN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme.
- Les banques créées à partir de l'ADN génomique purifié des différents types cellulaires sont **strictement identiques**.



CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNG



CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNG

- Insertion des molécules recombinantes dans les bactéries hôtes par transformation.

Transformation

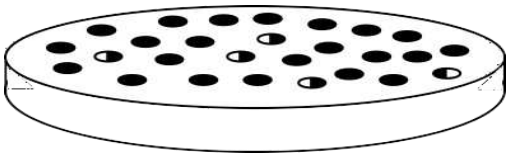
ADN recombinant 1

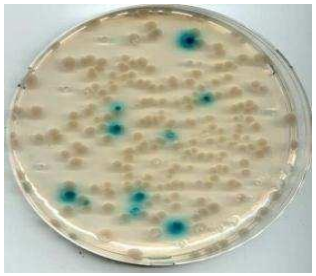
ADN recombinant 2

…

Sélection

- Sélection et identification des clones ayant récupérés une molécule d'ADN recombinante (ex. screen blanc/bleu).

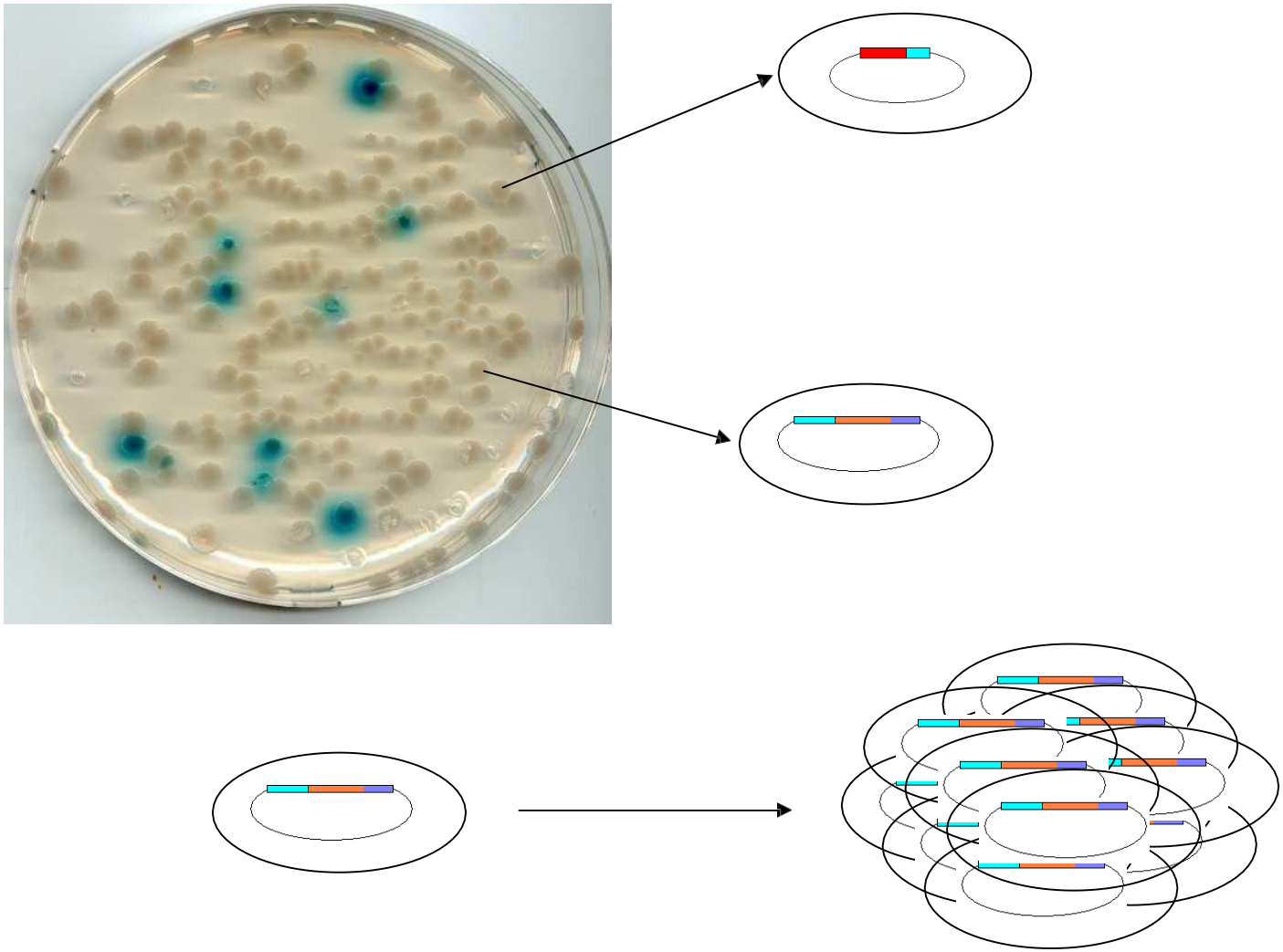




Antibiotique + X-gal

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNG

Chaque colonie contient le même fragment ADN et chaque colonie contient un seul type d'ADN recombinant



Que trouve-t-on dans l'ADN cloné d'une banque d'ADN génomique

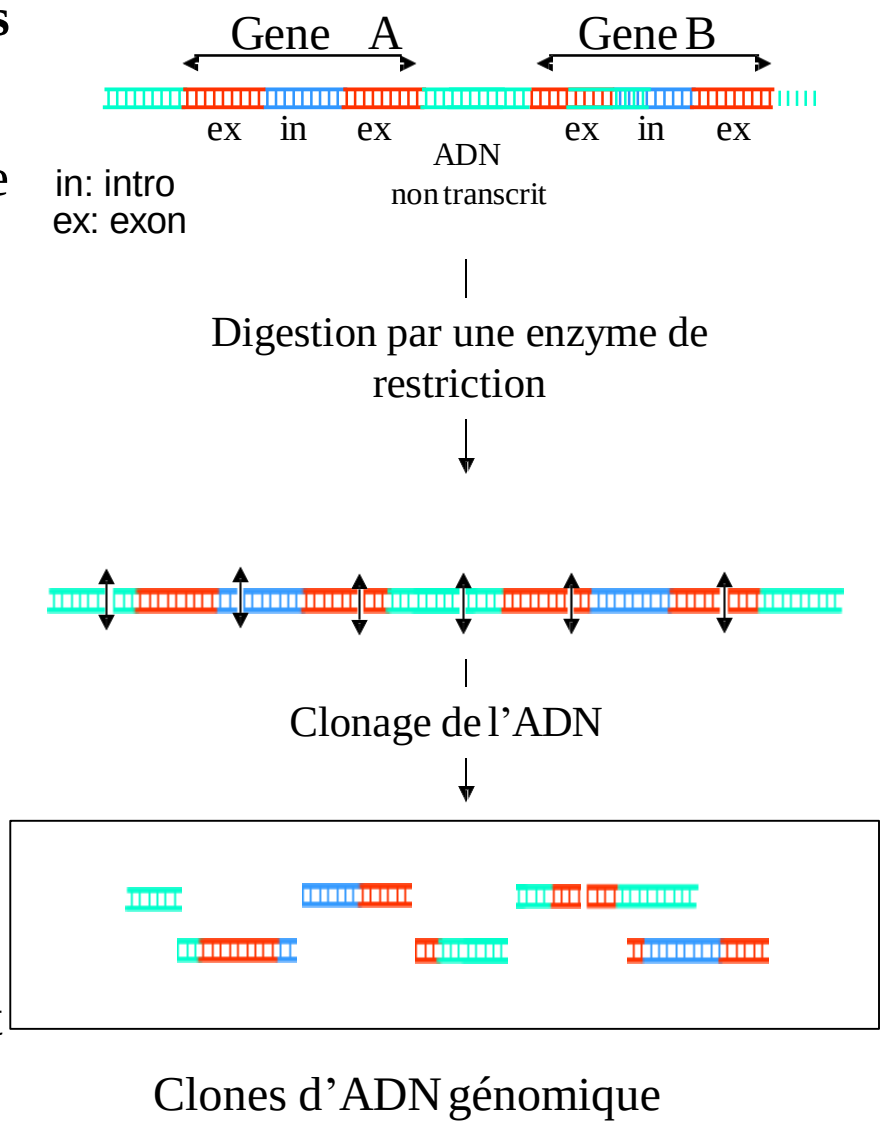
- Les banques d'ADN génomique contiennent **tous les gènes** présents dans l'organisme.

- Pour un organisme donné qu'elle que soit la cellule de départ, la banque génomique sera **toujours** la même.

- On retrouve dans les fragments d'ADN clonés.
  - -Les gènes morcelés (introns+exons).
  - -Les régions de régulation des gènes. (promoteur, sites activateurs et répresseurs)
  - -L'ADN intergénique (non codant et non régulateur).
  - -Les séquences répétées

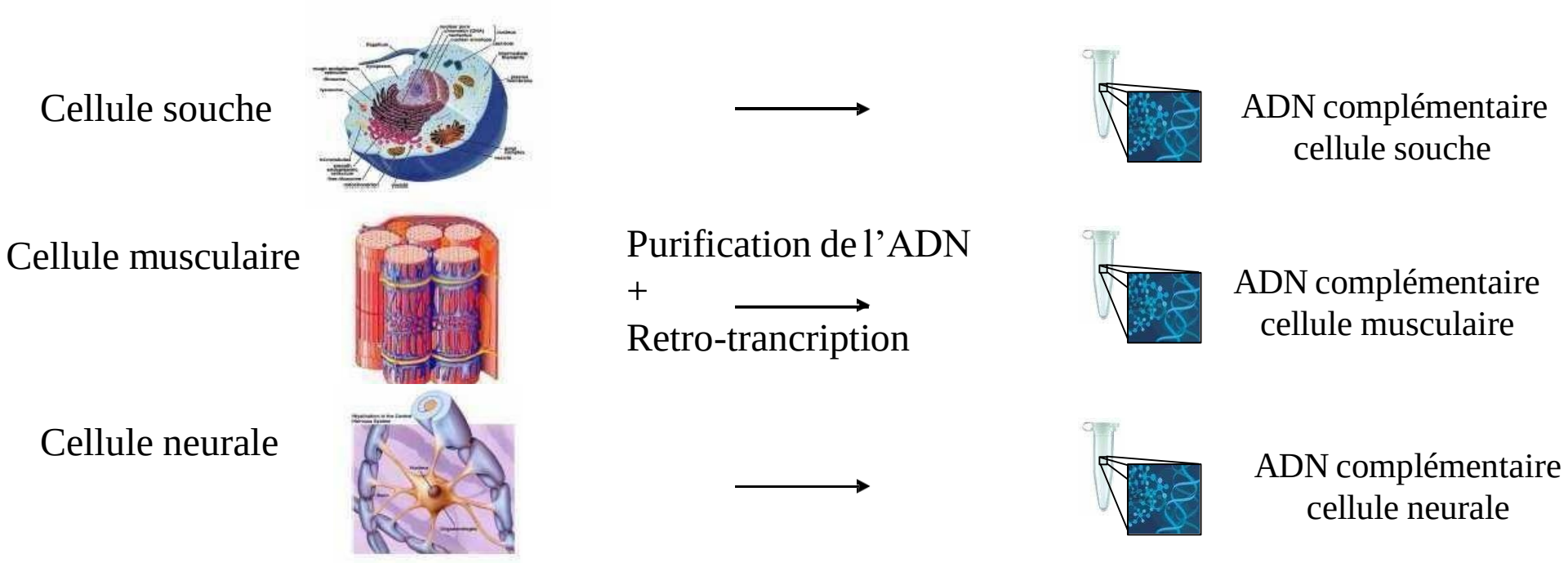
- Chaque gène est **représenté dans les mêmes** proportions au sein de la banque.

- Les gènes présents dans ces banques sont souvent interrompus.



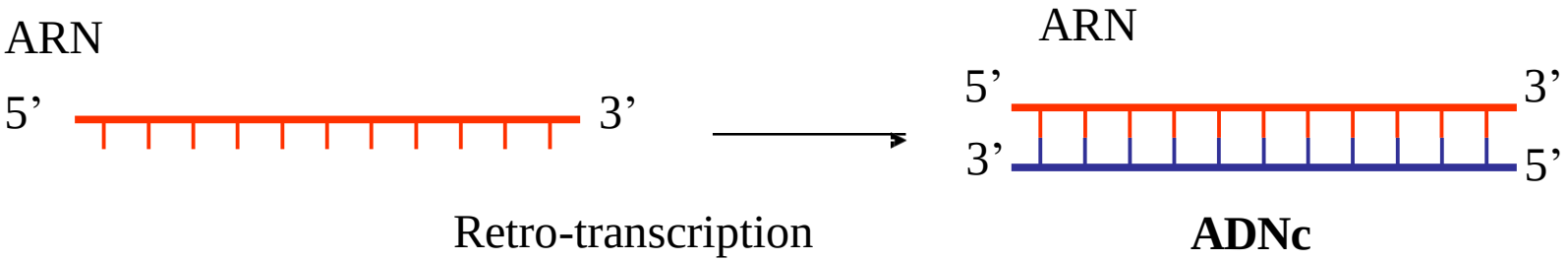
Origine de l'ADN d'une banque d'ADN complémentaire

- l'ADN cloné est l'ADN complémentaire issus de la retro-transcription de l'ARNm.
- L'ARN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers.
- Chaque type cellulaire exprime un lot donné de gènes donc pour un organisme l'ARN est différent pour chaque type cellulaire.



ADN COMPLÉMENTAIRE

- L'ADN complémentaire est un ADN synthétisé à partir d'une molécule d'ARN

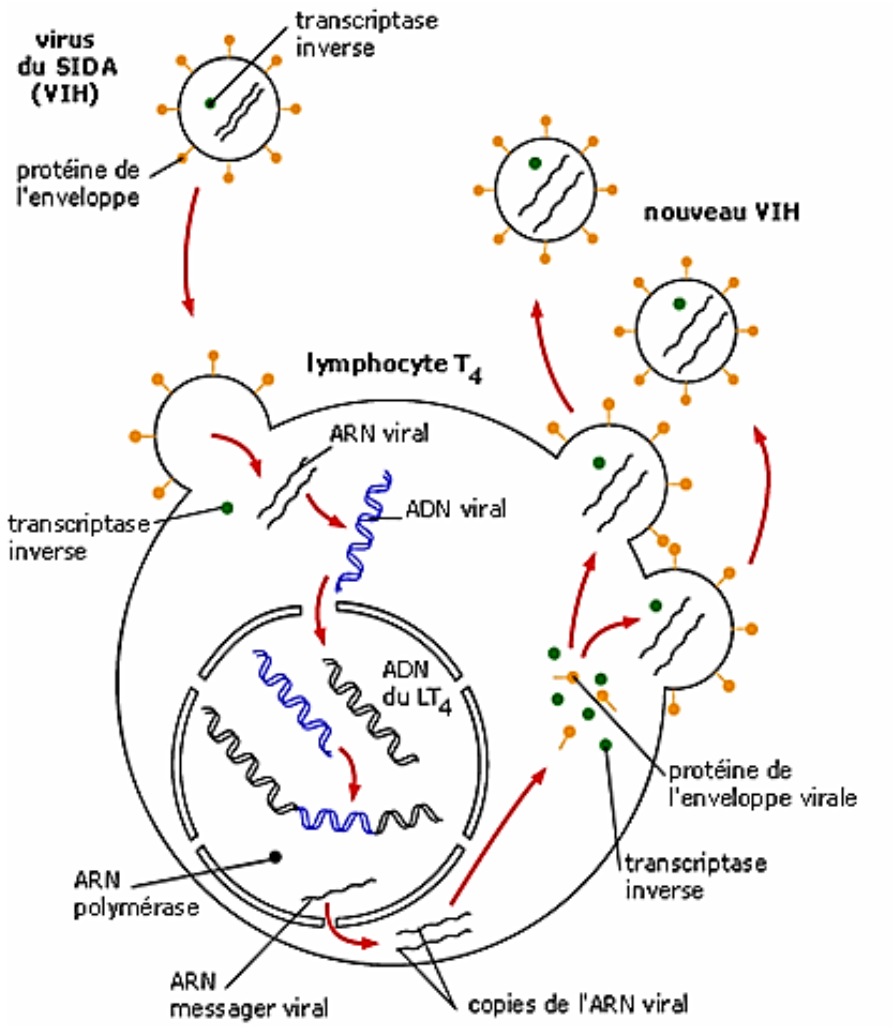


- L'ADN obtenu par **retro-transcripton** ou **reverse transcription** est complémentaire à l'ARN matrice: **c'est l'ADN complémentaire ADNc**

- L'enzyme qui assure la retro-transcription de l'ARN en ADNc est **la reverse transcriptase**

ORIGINE DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE

- Cette enzyme est présente chez les **rétrovirus** (**virus à ARN**).
- Elle intervient dans la conversion de leur génome ARN en génome ADN

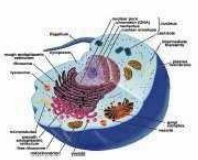


LA TRANSCRIPTASE INVERSE

C’est une enzyme qui possède les propriétés suivantes:

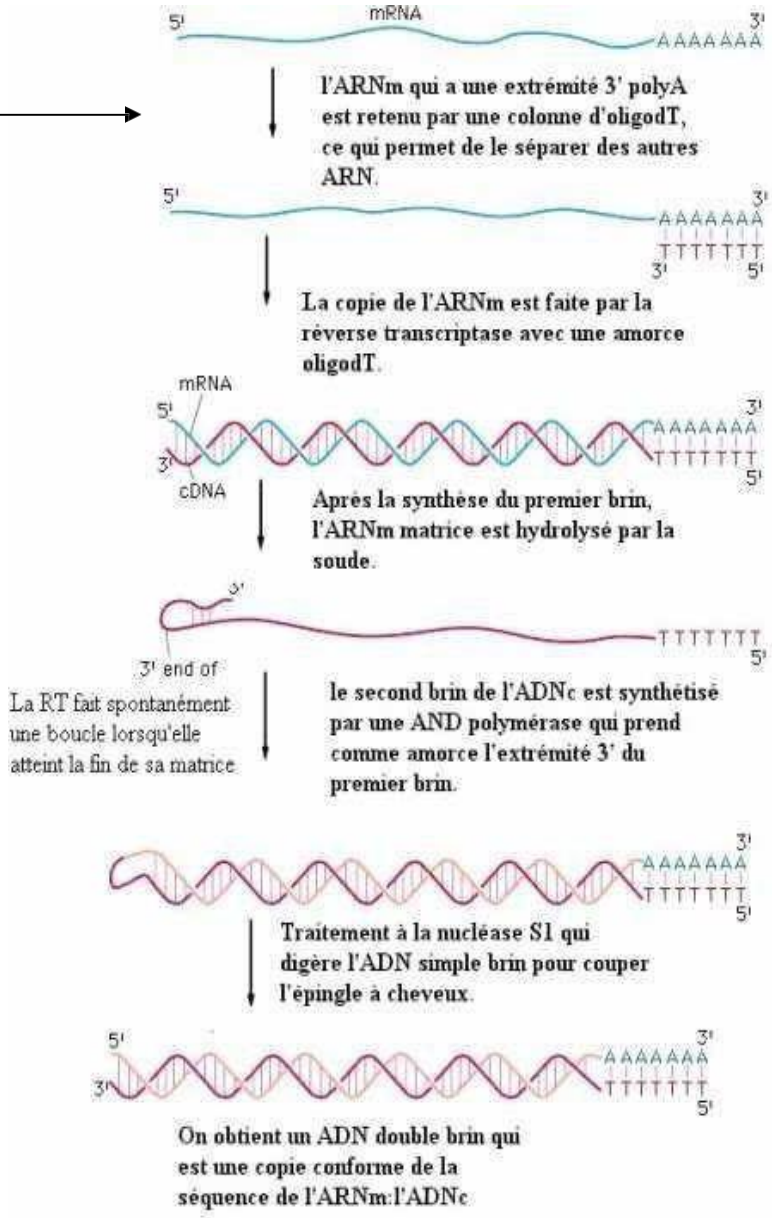
1. Une **ADN polymérase** qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5’à 3’
2. Une **ADN polymérase** qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5’à 3’
3. La transcriptase inverse est une ADN polymérase **ARN-dépendante**
4. Elle est dépourvue d’activité exonucléasique 3’à 5’ (pas de correction sur épreuve)
5. Comme toutes les ADN polymérase elle nécessite une amorce pour initier la transcription

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC



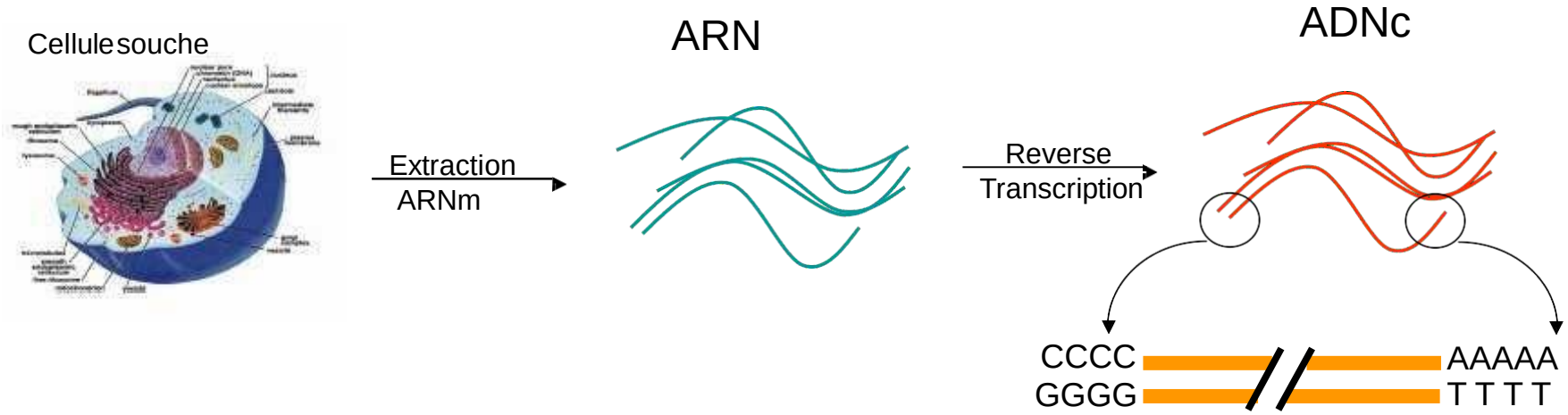
Cellule souche

Extraction ARNm



- L'ARN messager est extrait de la cellule, retro-transcript en ADNc double brin par l'action successive de la reverse transcriptase et de l'ADN polymérase.
- A la fin de cette étape, on obtient un ensemble de macromolécule d'ADN double brin.

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC



Comment cloner ces fragments d'ADNc?

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC

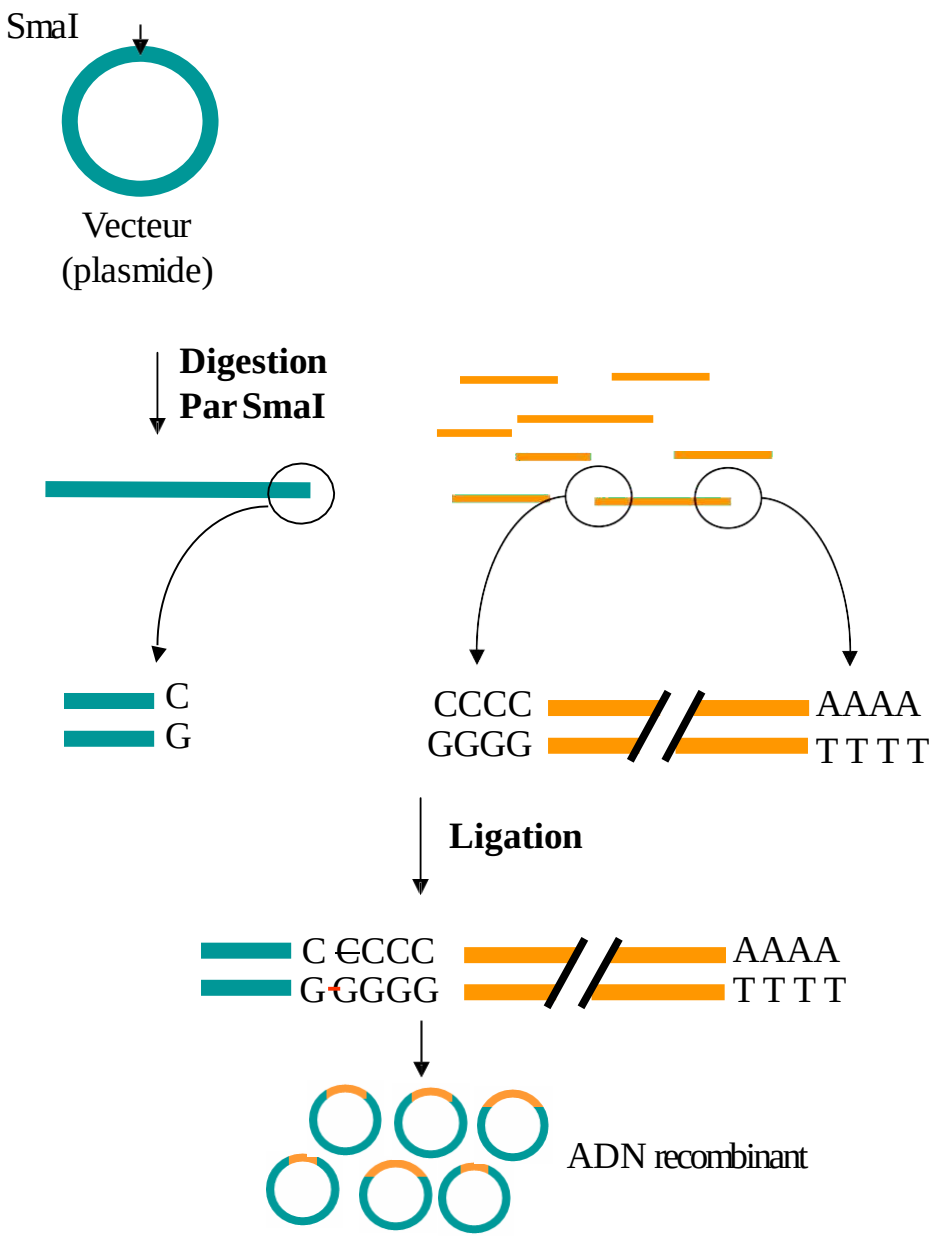
Il existe deux grandes méthodes pour cloner les fragments d'ADNc dans un vecteur de clonage

- La méthode des bords francs

- La méthode d'ajout d'un linker

MÉTHODE BORD FRANC

- Le vecteur est digéré par une enzyme de restriction générant de bord franc (ex: smaI)
- L'ADN complémentaire n'a pas besoin d'être coupé car il a deux bords francs à chacune de ces extrémités



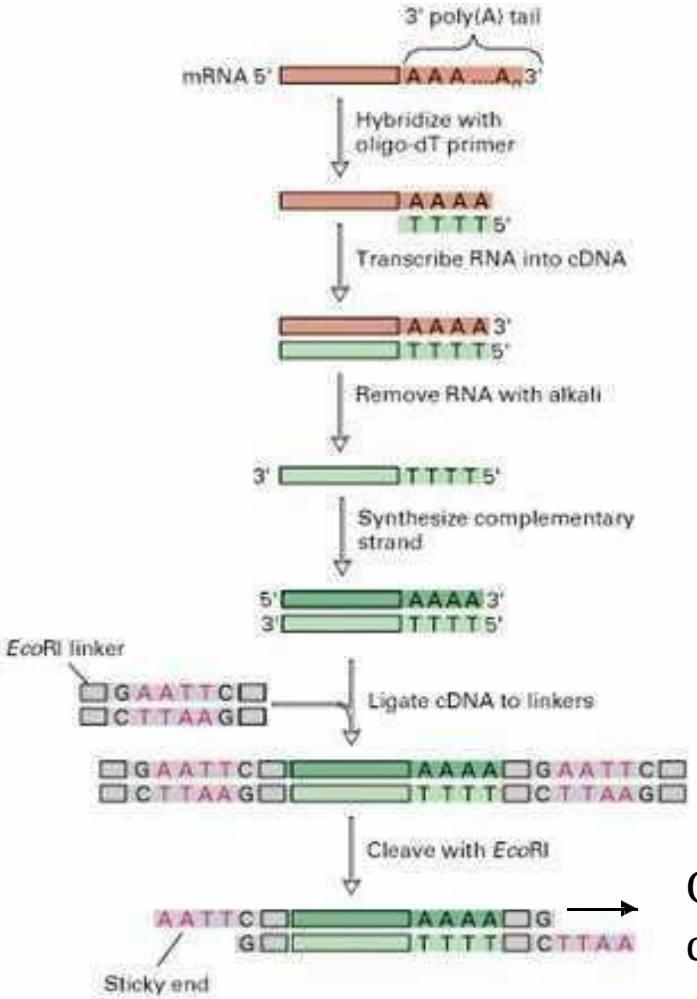
LINKER DE CLONAGE

On va ajouter aux extrémités de l'ADNc des petites séquences ADN contenant un site de restriction

Synthèse de l'ADNc

Ajout des séquences linker

Digestion par l'enzyme de restriction présent dans le linker

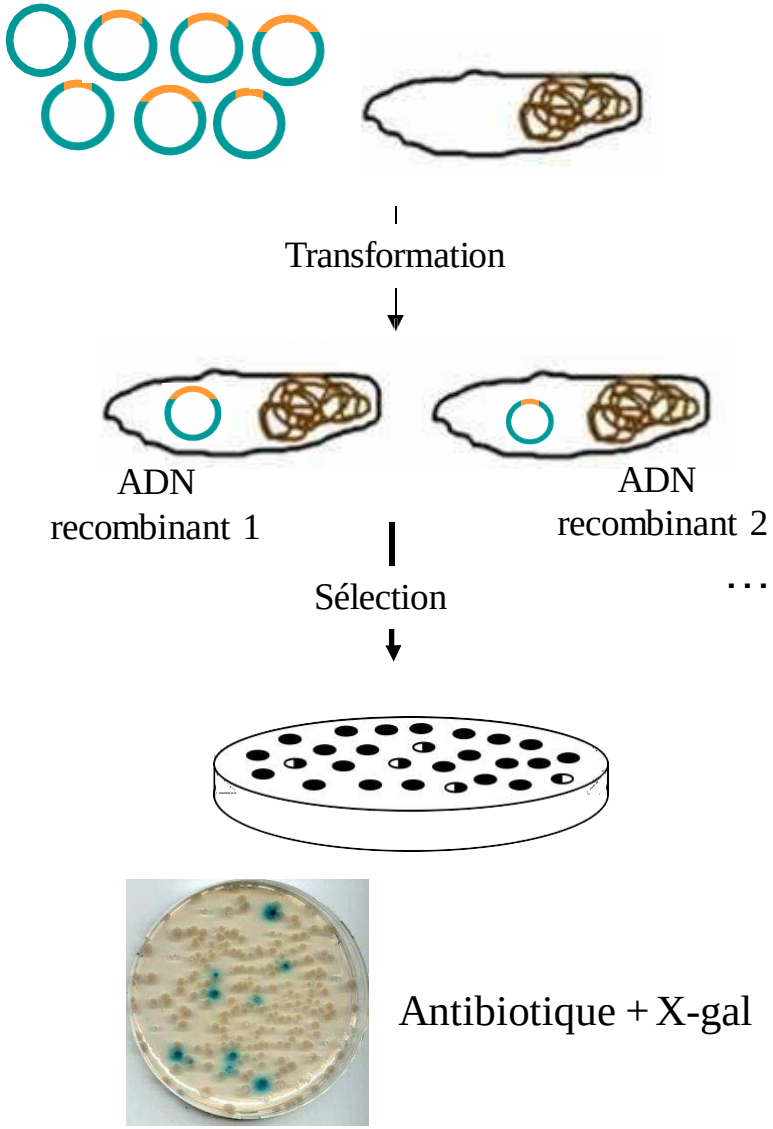


Clonage classique dans un vecteur

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC

Insertion des molécules recombinantes dans les bactéries hôtes par **transformation**.

Sélection et **identification** des clones ayant récupérés une molécule d'ADN recombinante et d'éliminer les clones ayant récupérés un vecteur « vide » (ex screen blanc/bleu)



Que trouve-t-on dans l'ADNc cloné

-Pour un organisme donné (l'homme) l'ADN contenu la banque d'ADNc sera dépendant du choix de la cellule d'origine (ex musculaire ou nerveuse).

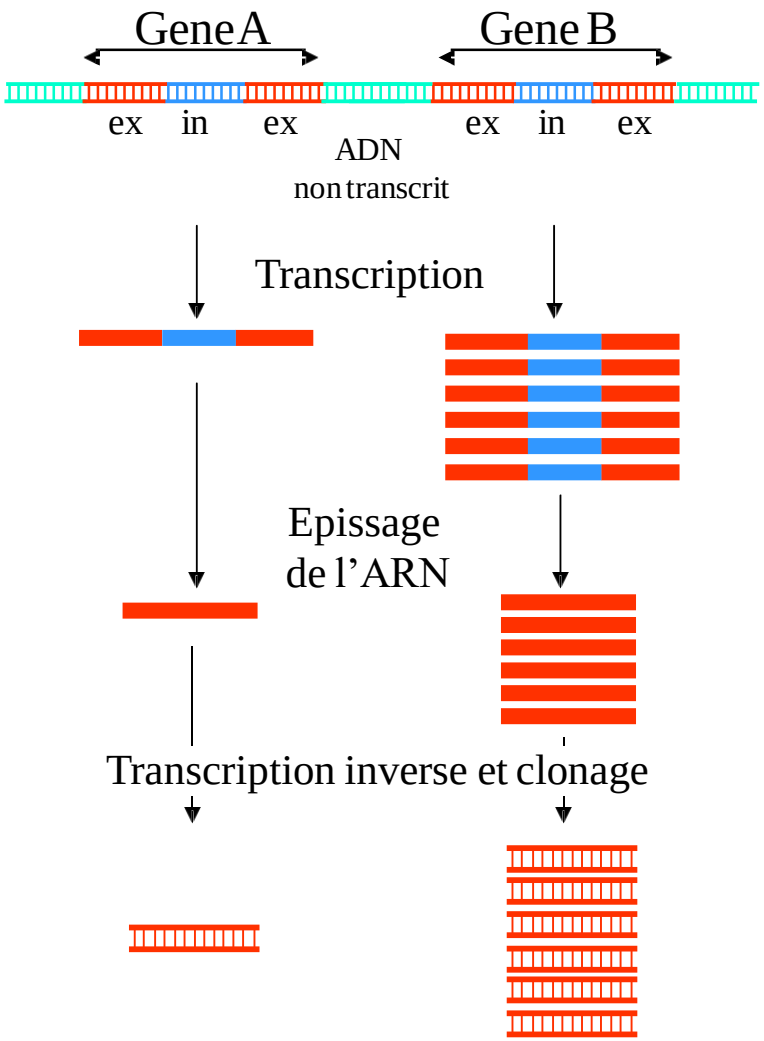
-Les banques d'ADN complémentaire ne contiennent que les gènes exprimés dans la cellule choisie pour la construction de la banque.

-On retrouve dans les fragments d'ADN clonés.

- -Les gènes non morcelés (exons seulement).
- -Les régions régulatrices et intergéniques sont absentes de ce type de banque.

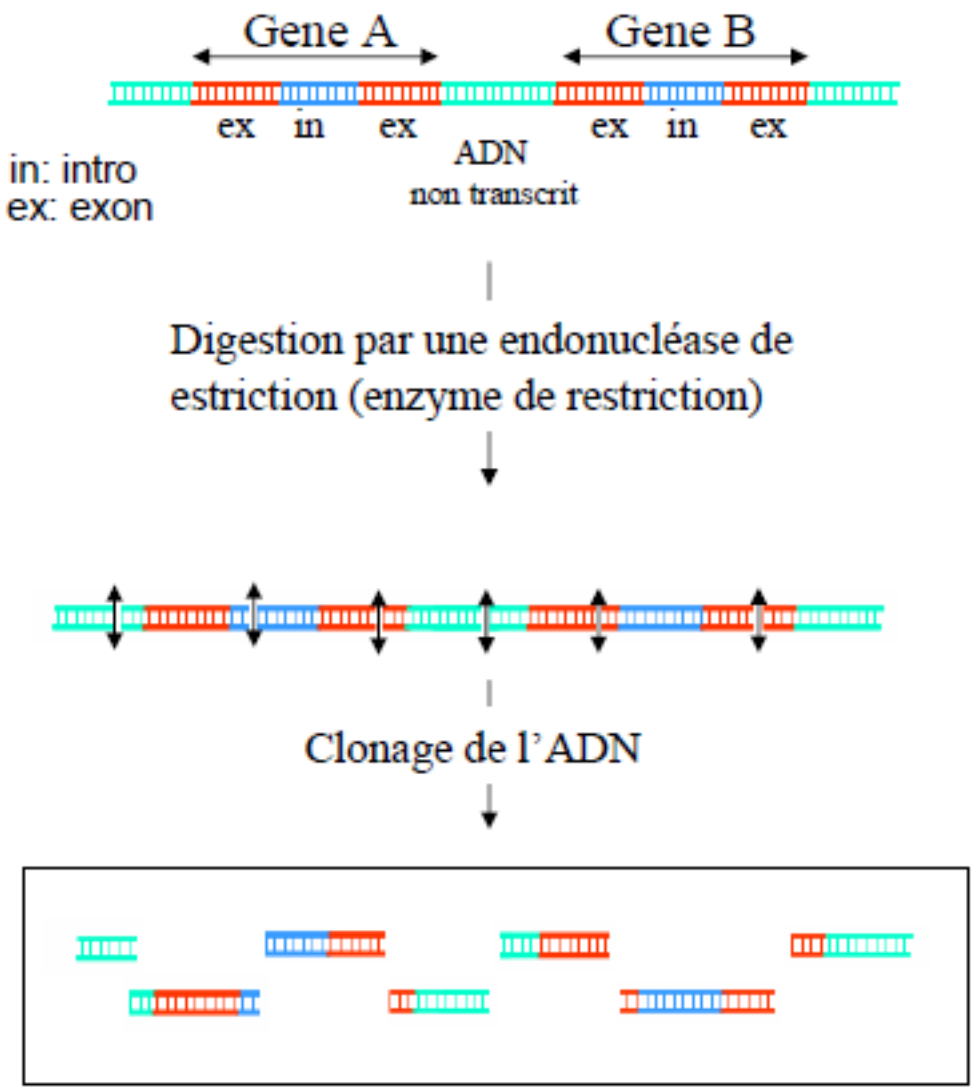
-Chaque gène de la banque n'est pas représenté de la même façon, c-à-d plus un gène est transcrit plus il est représenté dans la banque.

-Les gènes présents dans ces banques sont ininterrompus.

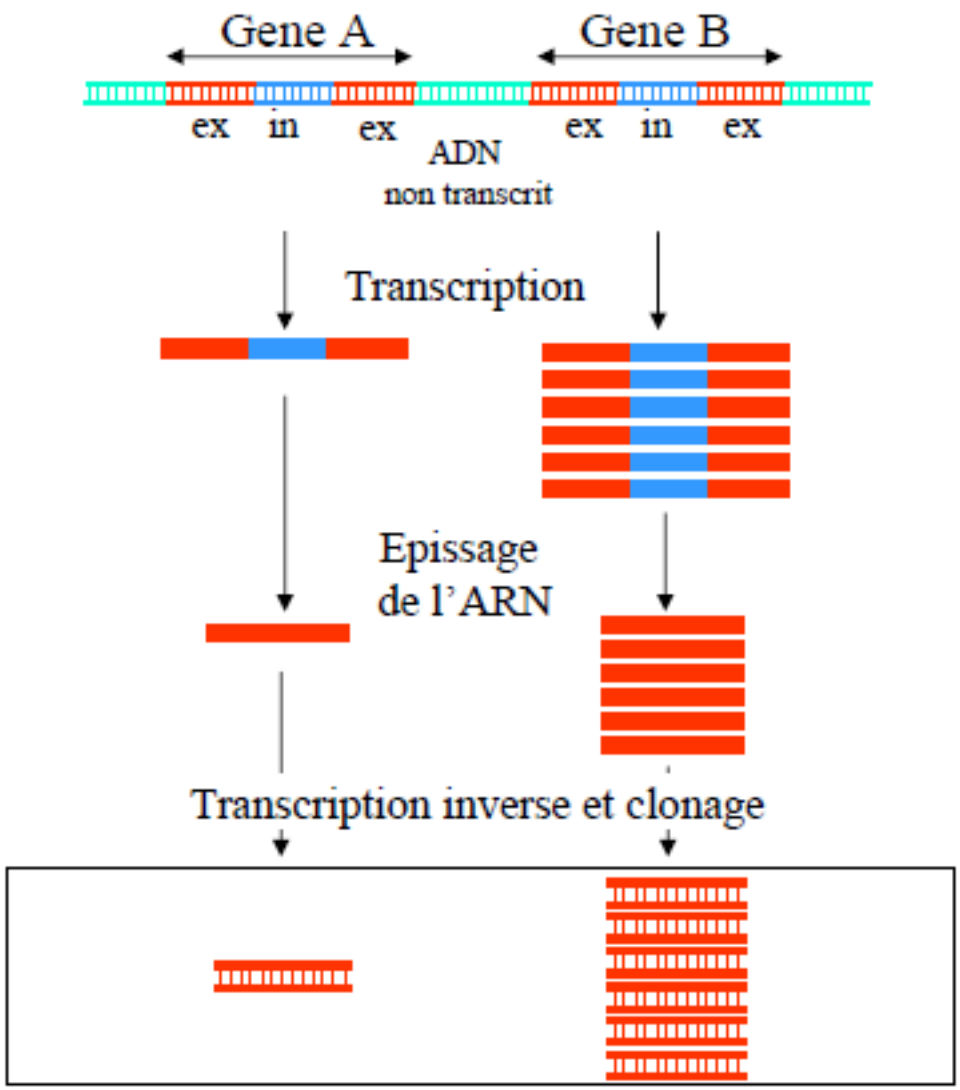


Clones d'ADN complémentaire

Comparaison entre les banques d'ADN génomique et ADN complémentaire



Clones d'ADN génomiques



Clones d'ADN complémentaires

LE SÉQUENÇAGE DE L’ADN

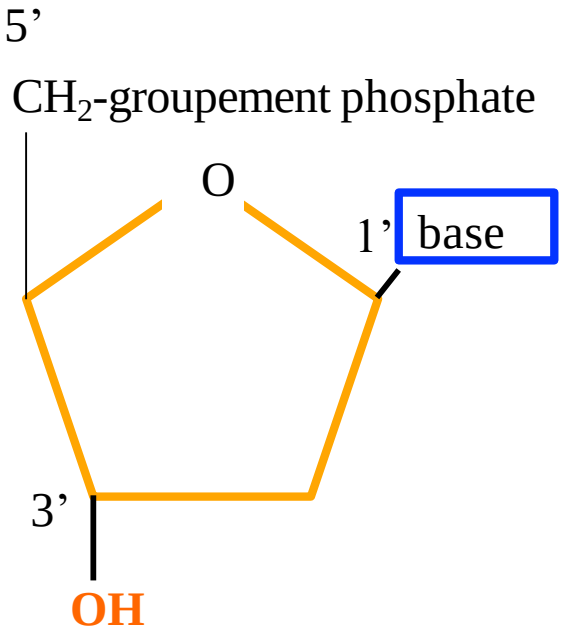
- Le séquençage de l’ADN est la détermination de la succession des nucléotides le composant.
- C’est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie.
- Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

LE SÉQUENÇAGE SELON LA TECHNIQUE DE SANGER

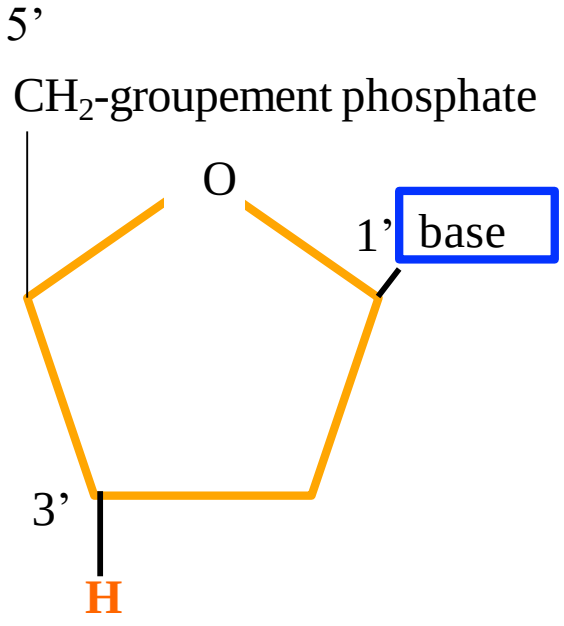
Synthèse d'un Brin ADN par une ADN polymèrase.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides **(ddNTP)** au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP). Les ddNTP diffèrents des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'.

Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : **la synthèse du brin d'ADN s'arrête.**



OH présent en 3' :
dNTP

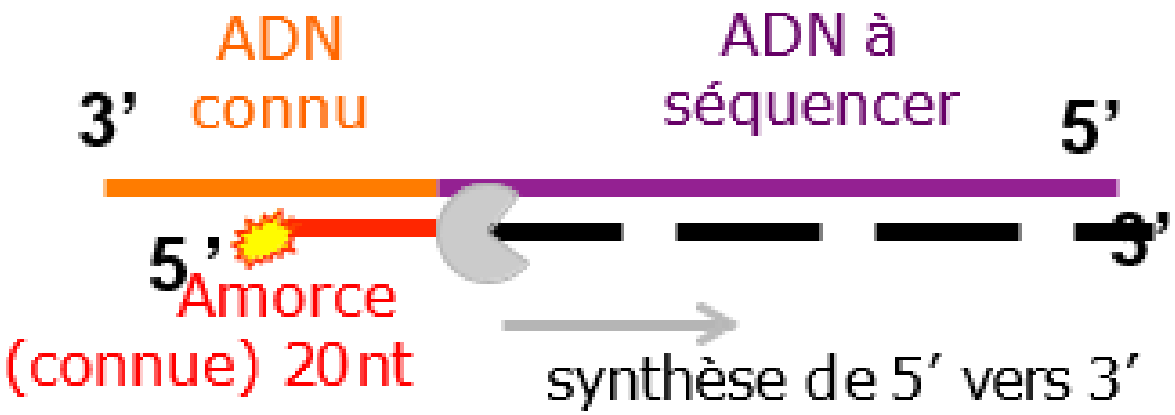


OH absent en 3' :
ddNTP

PROTOCOLE

Il faut préparer 4 mélanges:

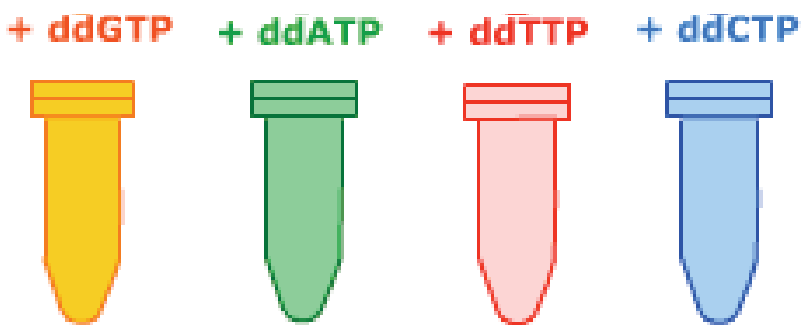
- Le fragment qui doit être séquencé
- Un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer (oligonucléotides)
- Les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- L'ADN polymérase



PROTOCOLE

Préparation de 4 mélanges contenant:

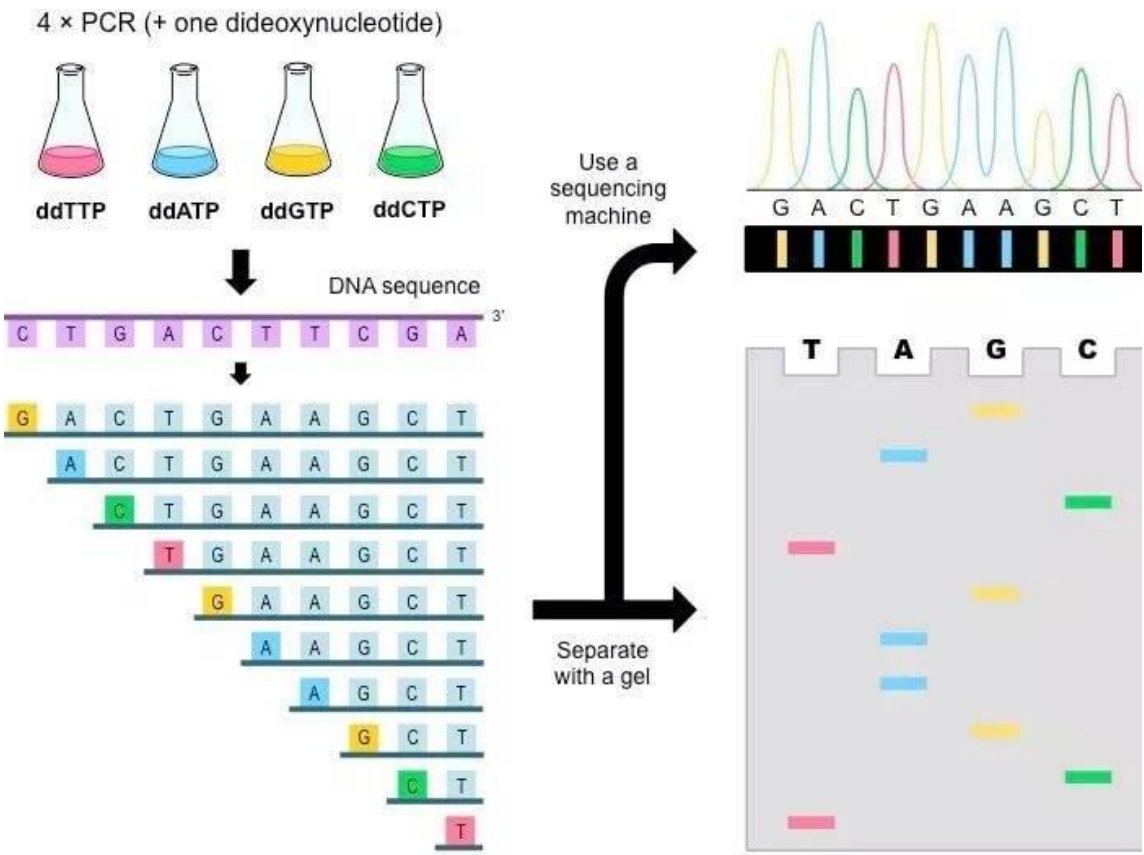
- Le fragment qui doit être séquencé
- Un petit fragment d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer (oligonucléotides ou amorces)
- Les 4 dNTP s (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- L'ADN polymérase
- Dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif



PROTOCOLE

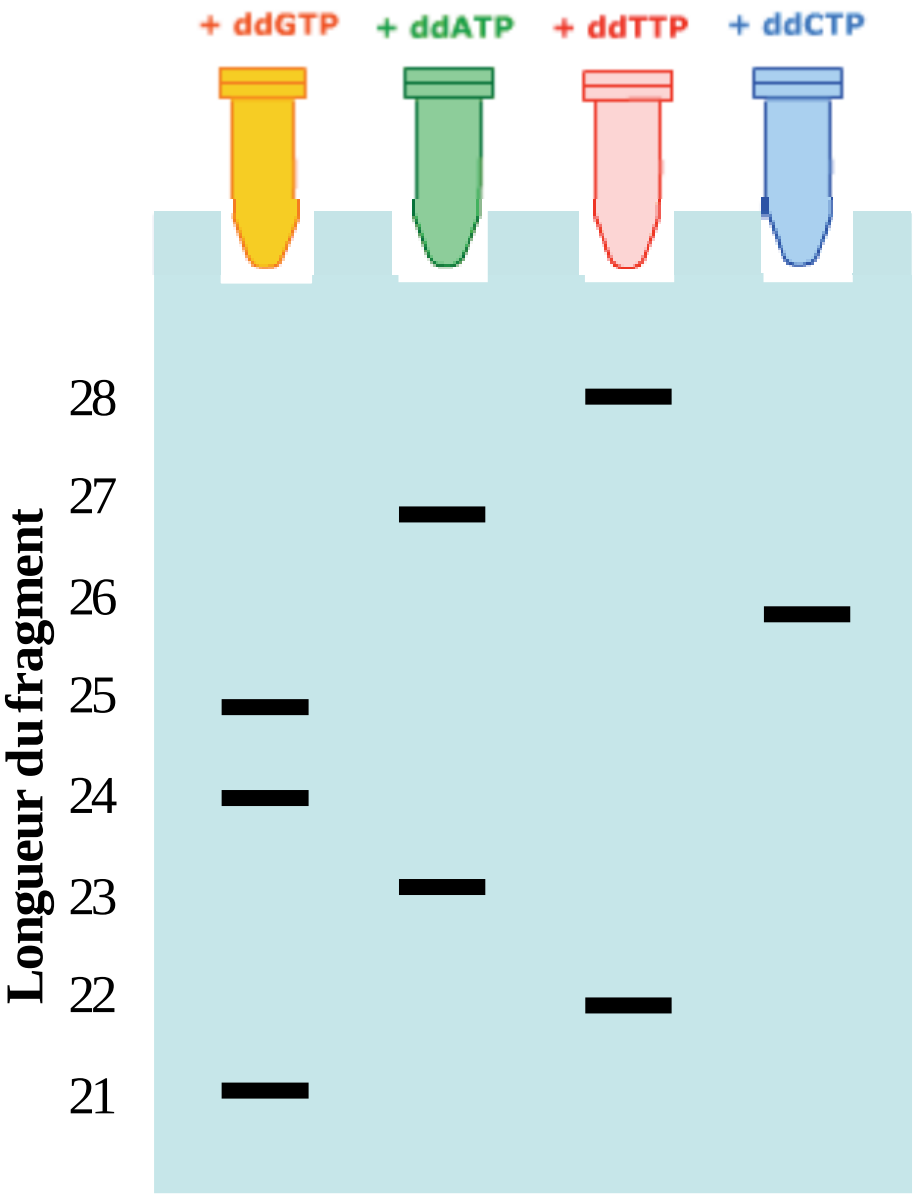
On obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée.

NB: Synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il s'agit d'une cytosine sur la séquence.



LECTURE DES BRINS

Migration électrophorétique (4 colonnes)



GTAGGCAT →

GTAGGCA

GTAGGC

GTAGG

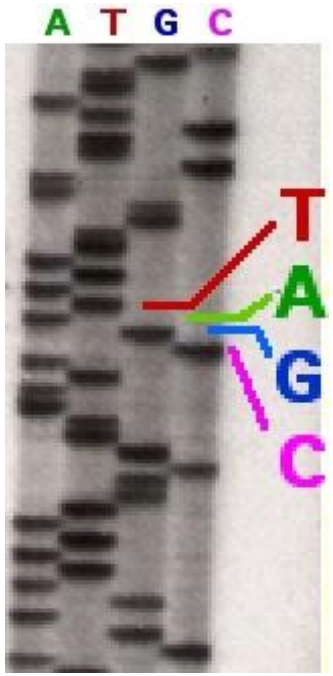
GTAG

GTA

GT

G

ADN à séquencer
5'-ATGCCTAC-3'



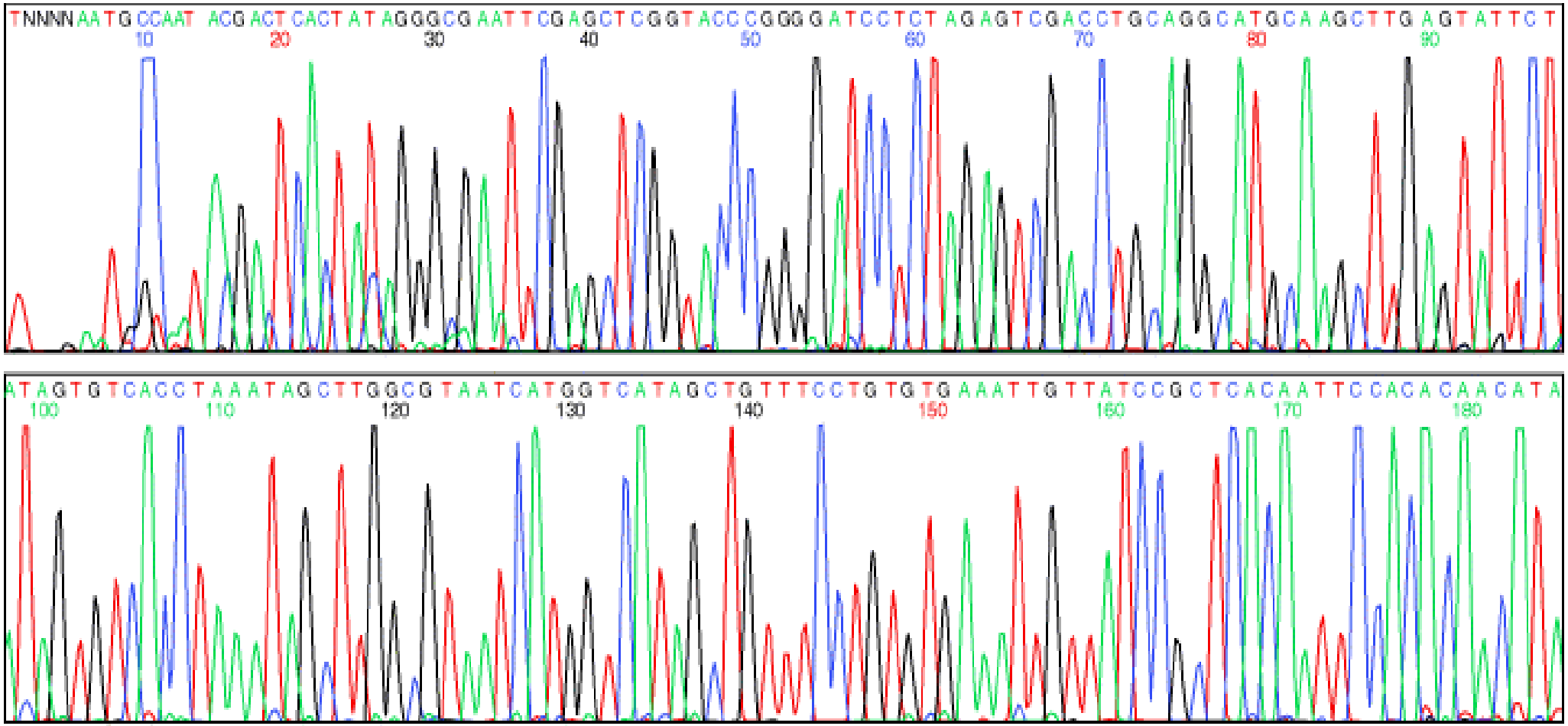
Exemple d'auto-radiographie (marquage ^{32}P) d'un gel d'électrophorèse

L'AUTOMATISATION DU SÉQUENÇAGE

Séquenceurs automatiques

- Capables de réaliser les réactions de séquence puis de les lire.
- Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie.
- Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

Exemple d’enregistrement obtenu à partir d’un séquenceur automatique



Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants.