

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Chapitre III : LES BANQUES D'ADN

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

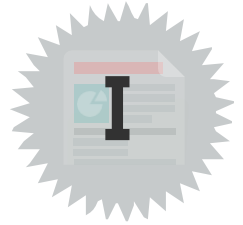
Email: s.selka.sek@gmail.com

1.0

Table des matières

Chapitre III: LES BANQUES D'ADN	3
I. Banques d'ADN génomique	3
1. Construction	3
2. Clonage dans des vecteurs.....	3
II. Banques d'ADNc (complémentaire).....	4
1. Préparation	4
2. Synthèse de l'ADNc	5
3. Traitement des extrémités.....	6
4. Ligation à un vecteur.....	6
III. Criblage des banques.....	7
1. Criblage des banques d'ADNc.....	7
2. Criblage des banques d'ADN génomique.....	8

Chapitre III : LES BANQUES D'ADN



I. Banques d'ADN génomique

Une banque génomique est une collection de la **totalité du génome, fragmenté** et cloné dans des vecteurs, Elle permet d'obtenir des informations sur la structure complète d'un gène, y compris les introns et les régions régulatrices.

L'ADN cloné contient aussi bien les séquences codantes et les séquences non codantes (introniques ou intergéniques).

1- Construction :

- **Purification :**

Purification d'ADN des eucaryotes : élimination des protéines, lipides

Purification d'ADN des procaryotes : Extraction directe.

- **Fragmentation aléatoire de l'ADN :**

C'est La totalité du génome obtenue par fragmentation est cloné dans des vecteurs dans le but d'étudier la totalité de génome avec ces introns, exons, régions intergéniques et les régions régulatrices.

a- Cisaillement physique:

(Pipetage, Mixage, ultrasons : ondes mécanique) fractionnera progressivement l'ADN, on obtient des fragments au hasard.

C'est la fragmentation (coupure) de l'ADN aléatoire, si on aura des extrémité franche mal formé on ajoute l'enzyme Klonew (compléter les nucléotides qui manque).

b- Digestion partielle:

Utilisation de quantité limitée d'enzyme de restriction en un temps limité (ne va pas couper dans tous les sites de reconnaissance)

L'enzyme la plus utilisée Sau3A

2- Clonage dans des vecteurs :

Des plasmides, phages, cosmides, YAC sont utilisés

Le choix dépend de la taille du fragment inséré

Ligation par la ligase

Le vecteur recombinant est introduit par la suite dans la cellule hôte.

Empaquetage et propagation pour créer une banque

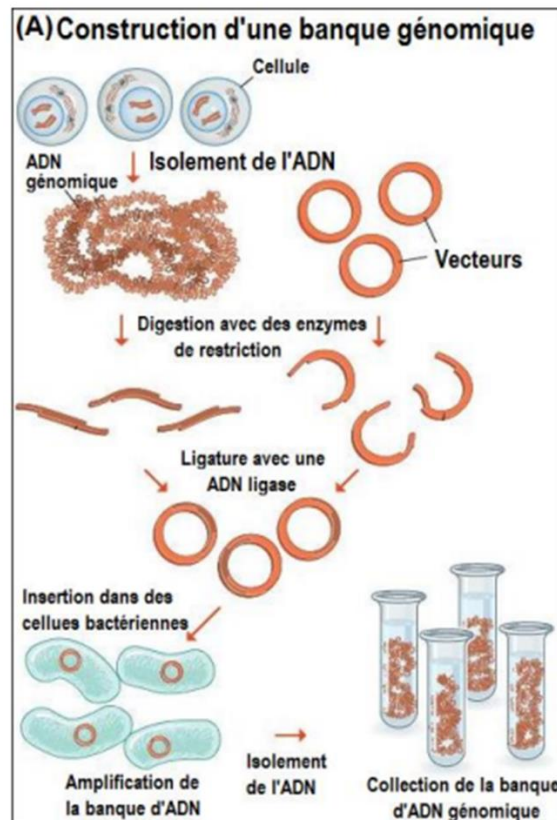


Fig.1 : Les étapes de la construction d'une banque génomique

II- BANQUES D'ADNc (COMPLEMENTAIRE)

Une banque d'ADNc est une collection d'ADN complémentaires (ADNc) obtenus par transcription inverse des ARNm d'un organisme donné.

Une banque d'ADNc est une collection d'ADNc recombinant (cloné dans des vecteurs), cette collection contient toutes **les séquences codantes** des protéines exprimées dans un tissu donné, elle est particulièrement utile pour étudier l'expression génique.

1.Préparation :

Extraction de l'ARNm des cellules.

Transcription inverse de l'ARNm pour obtenir des ADNc.

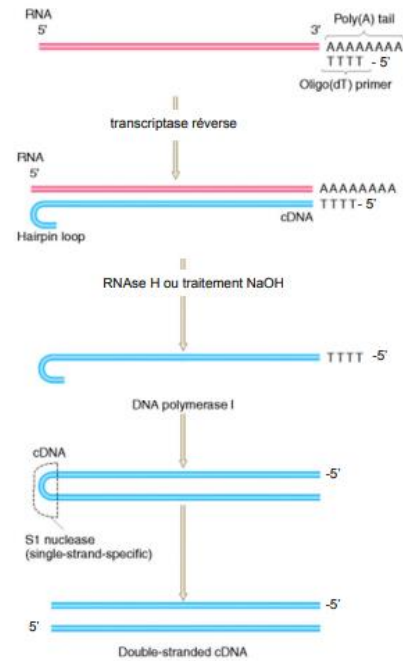
- ARN est polyadénylé

- Isolement des ARNm en utilisant des billes magnétiques (oligoT)

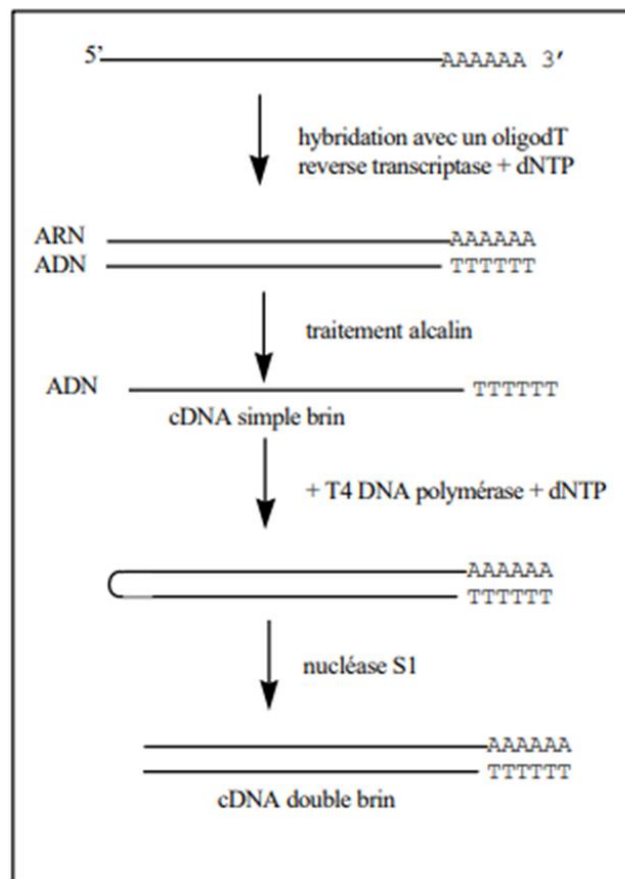
? Remarque

2.Synthèse de l'ADNc :

- Obtention d'un ADNc

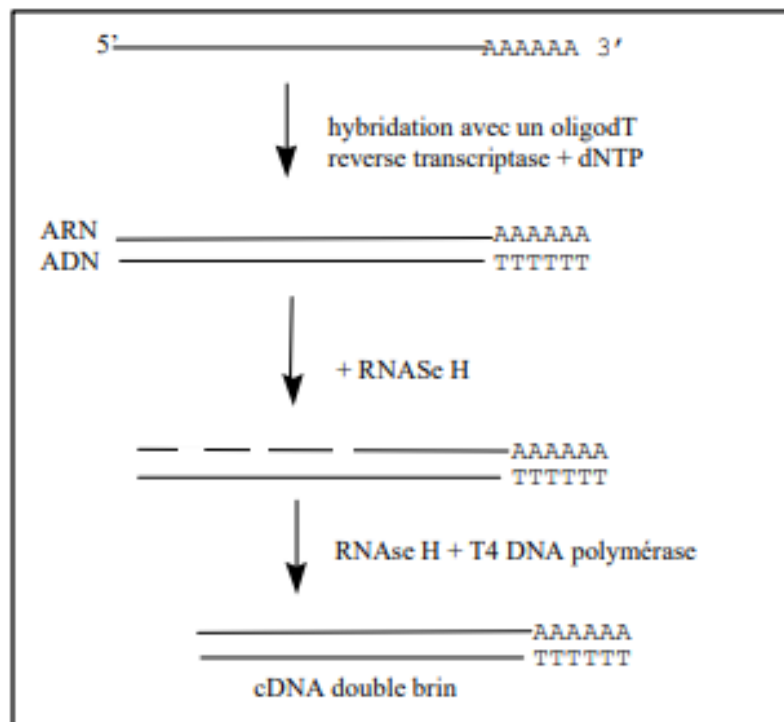


a. Technique de la nucléase S1



b. Technique de Gubler et Hoffman

Technique de Gubler et Hoffman



3- Traitement des extrémités :

- Pour éviter la ligation d'une extrémité franche de l'ADNc à un vecteur → ajout de linker
- **Utilisation des nucléases S1:** enlever les extrémités qui dépassent
- **Enzyme de klenow:** remplir des nucléotides oubliés

4- Ligation à un vecteur :

- Vecteur habituellement déphosphorylé
- Plasmides et phages sont utilisés

Insertion de l'ADNc dans des vecteurs et introduction dans des cellules hôtes (ex : bactéries).

Criblage pour identifier les colonies qui contiennent le gène d'intérêt, souvent en utilisant des sondes spécifiques ou par sélection fonctionnelle.

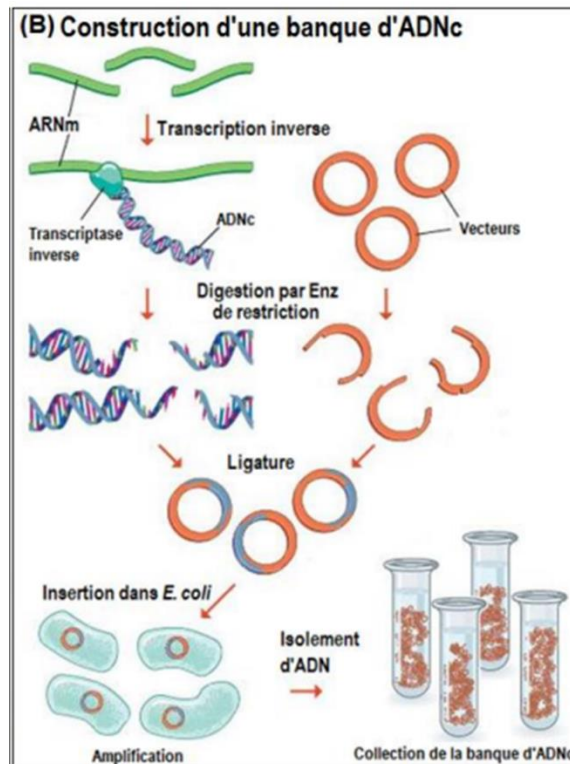


Fig.2 : Les étapes de la construction d'une banque d'ADNc

III- CRIBLAGE DES BANQUES

Le criblage des banques d'ADNc et des banques d'ADN génomique est une méthode essentielle en biologie moléculaire pour identifier des séquences d'ADN d'intérêt dans une collection d'échantillons d'ADN.

Dans les deux cas, le criblage peut se faire par **des sondes spécifiques d'ADN (identifier des séquences complémentaires)**, par hybridation avec des séquences d'intérêt,

Voici les principales différences et étapes de ces deux types de criblage :

1. Criblage des banques d'ADNc :

- **Transfert sur une membrane :**

Les clones sont cultivés sur une boîte de culture et transférés sur une membrane (nylon ou nitrocellulose) pour obtenir une empreinte des clones. Une fois fixés sur la membrane, les clones sont lysés pour libérer l'ADNc.

- **Hybridation avec une sonde spécifique :**

Une sonde complémentaire à la séquence d'ADNc recherchée est préparée, elle peut être marquée avec un isotope radioactif, un agent fluorescent, ou une enzyme colorimétrique.

La membrane est incubée avec cette sonde. Lorsqu'elle rencontre une séquence complémentaire (c'est-à-dire l'ADNc d'intérêt), la sonde s'hybride à cette séquence.

- **Détection des clones positifs :**

Après l'hybridation, la membrane est lavée pour éliminer la sonde non liée, les zones où la sonde s'est fixée indiquent la présence de l'ADNc cible.

Selon le type de marquage :

- **Autoradiographie** pour une sonde radioactive.
- **Détection fluorescente** avec un scanner si la sonde est fluorescente.
- **Détection colorimétrique** si la sonde est liée à une enzyme.

Les positions des signaux détectés sur la membrane correspondent aux clones d'ADNc d'intérêt, et ces clones peuvent être récupérés de la banque d'origine.

2.Criblage des banques d'ADN génomique :

Le principe est comparable à celui d'une banque d'ADNc, mais l'isolement du clone recherché est plus laborieux, puisqu'il n'est pas toujours possible d'isoler un clone la totalité du gène

Il faut cribler les différents clones chevauchants pour avoir l'information sur la totalité du gène. Il existe différentes techniques :

1. Le criblage par antibiotique
2. Le criblage Bleu-Blanc
3. La méthode de sélection par hybridation moléculaire
4. La méthode de criblage par Complémentation
5. La méthode de coupure avec des enzymes de restriction.

Références :

- Cours de Génie génétique : Dr Ghembaza Boublenza. L, Université de Tlemcen, Faculté SNV, Algérie.
- TD Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques : ADN, ARN & PLASMIDES : Dr Leila Medraoui, Université de Rabat, Faculté des Sciences, Maroc.
- SUPPORT DE COURS de GENIE GENETIQUE : Dr. KHOUAJA Fattouma, Université DE LA MANOUBA, INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE SIDI THABET (ISBST) Tunisie.
- Polycopié de la matière de génie génétique incluant Les cours, les travaux dirigés et les travaux pratiques : Dr Fathi Berrabah, Université de Djelfa, Faculté SNV, Algérie.
- www.medatice-grenoble.fr chapitre 8 méthodes d'études en biologie moléculaire.