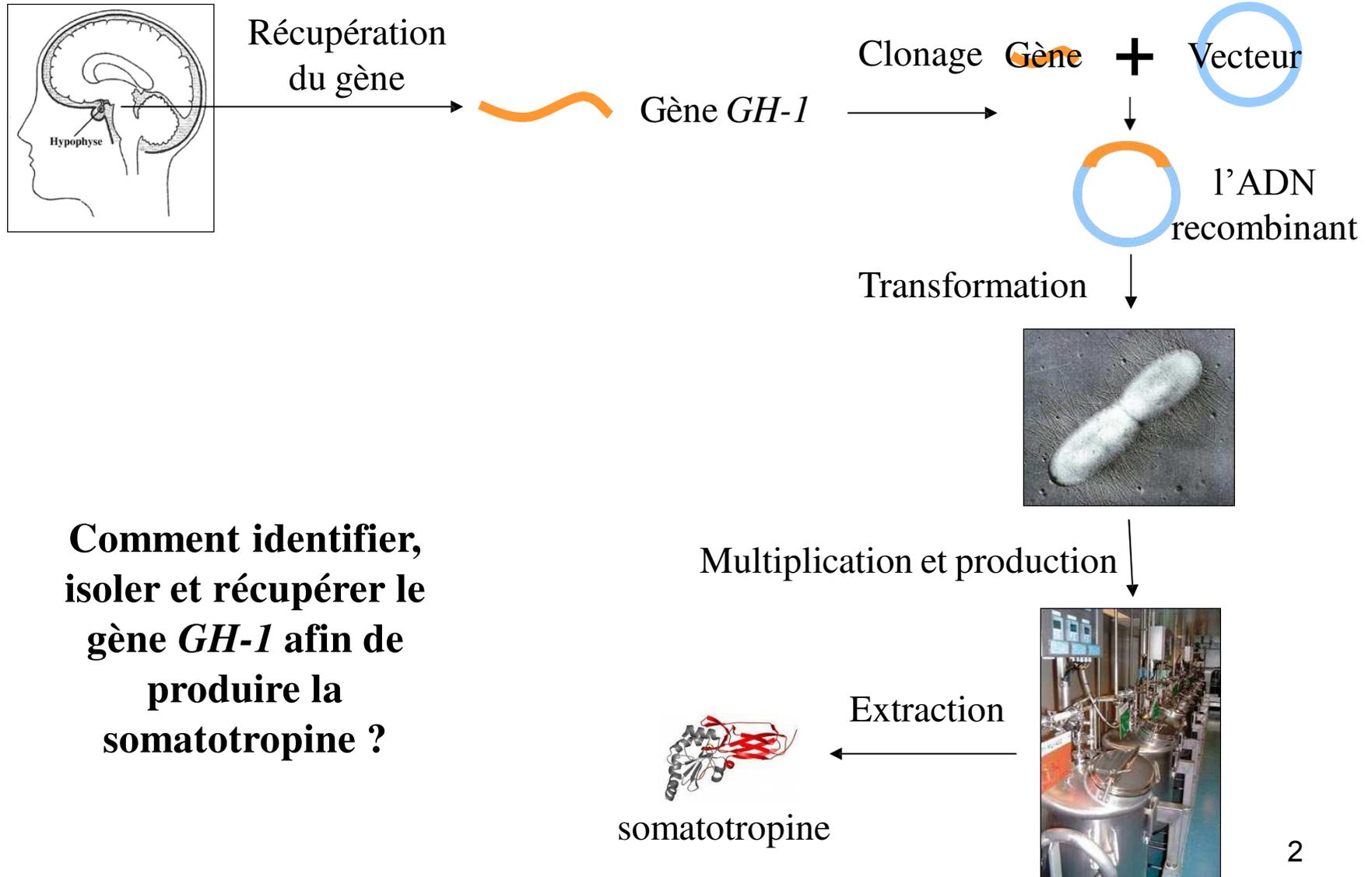




Connaissance et Technique du gène

« Les banques à ADN »
Les banques d'ADN génomique

Rappel sur le concept du clonage génétique

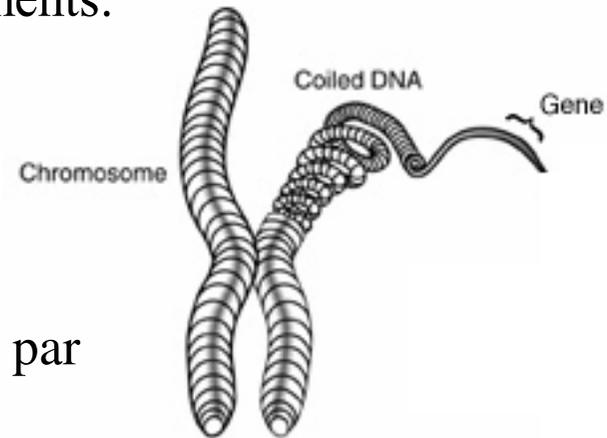


Comment identifier, isoler et récupérer le gène *GH-1* afin de produire la somatotropine ?

La problématique

-On retrouve sur l'ADN du génome plusieurs éléments:

- Les gènes qui codent les protéines.
- Les séquences intergéniques
- Les séquences répétées en tandem



-Le génome humain comporte 30000 gènes portés par 23 paires de chromosome.

-Le gène *GH-1* n'est qu'un gène parmi les 30000 autres gènes.

Idée :

- **Isoler** les différents gènes, **les multiplier** et **rechercher** le fragment qui porte le gène *GH-1*.

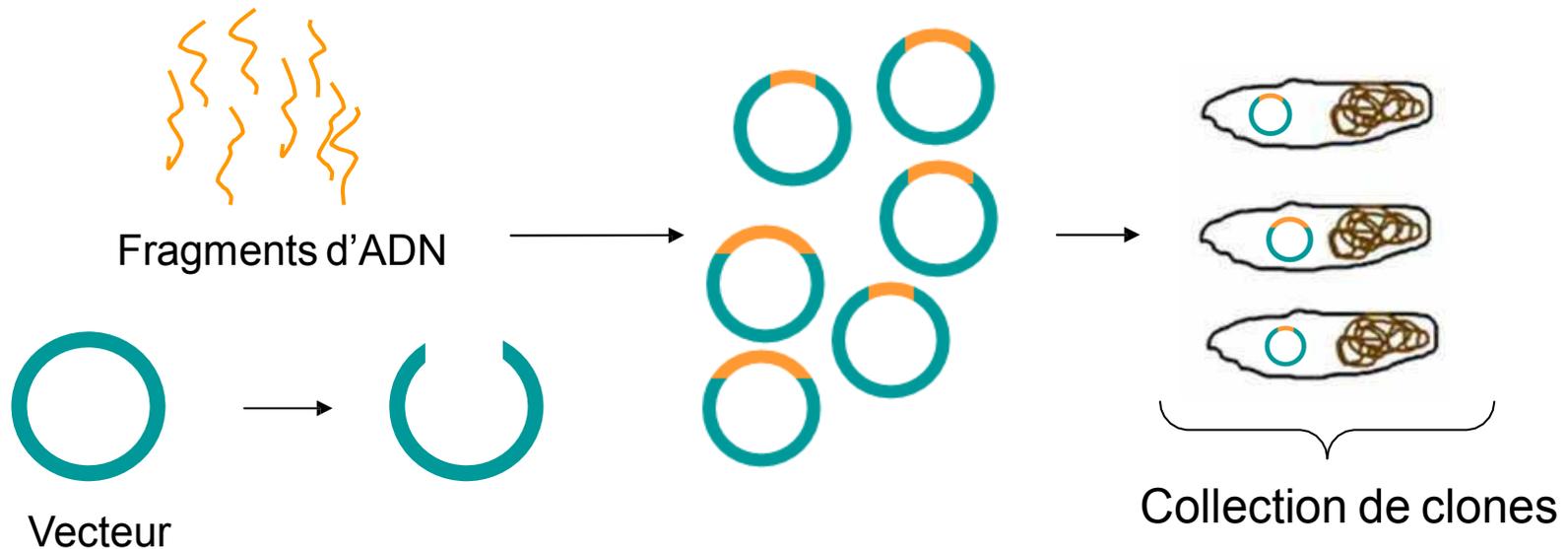


Banque d'ADN

Définition et Intérêt d'une banque d'ADN

Définition:

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



Intérêt:

- Ensemble du génome segmenté en petit fragment
- Chaque fragment est isolé dans une bactérie différente
- Chaque fragment pourra être multiplié très facilement par la bactérie hôte

Les deux types de banque d'ADN

- On distingue deux type de banque ADN :

- **Les banques d'ADN génomique :**

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

- **Les banques d'ADN complémentaire ou ADNc:**

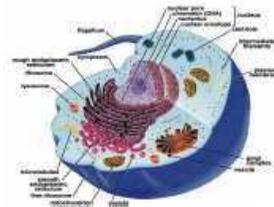
Collection de clones représentant l'ensemble des ARNm présent à un moment donné dans un tissu ou dans un organe donné.

Les banques d'ADN génomique

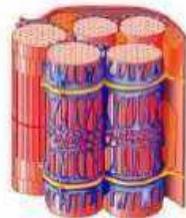
Origine de l'ADN d'une banque d'ADN génomique

- Dans une banque d'ADN génomique l'ADN cloné est **l'ADN chromosomique**.
- Cet ADN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme (bactéries ou bactériophage).
- Pour un organisme donné si on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même.

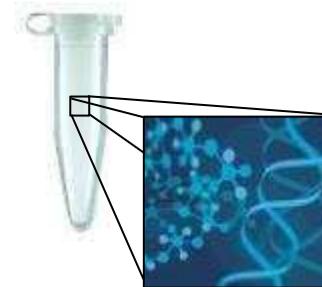
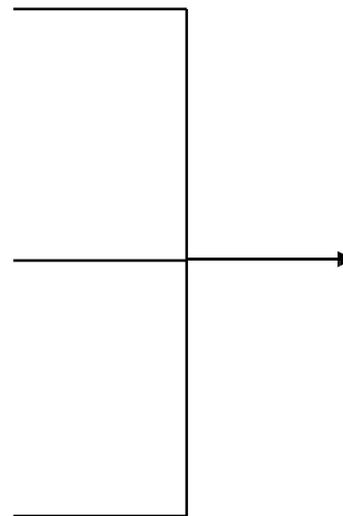
Cellule souche



Cellule musculaire



Cellule neurale



ADN génomique

Purification de l'ADN génomique

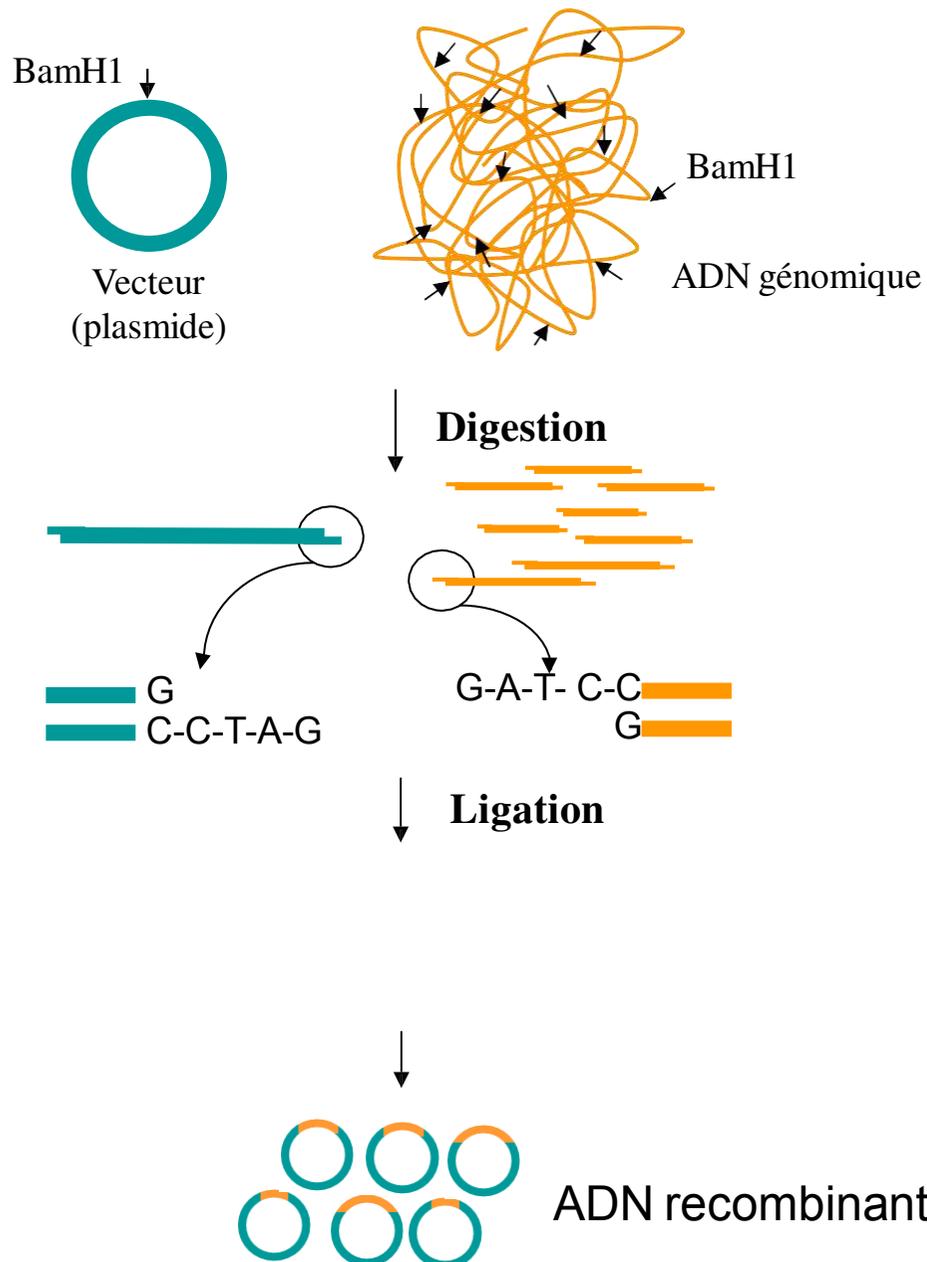
- Les banques créées à partir de l'ADN génomique purifié de ces différents types cellulaires seront **strictement identiques**.

Construction d'une banque d'ADN génomique

Première étape:

Coupage de l'ADN génomique par une ou plusieurs enzymes de restriction et ligation des fragments obtenus dans un vecteur de clonage.

Dans le cas d'une banque génomique l'hydrolyse de l'ADN donneur est partielle

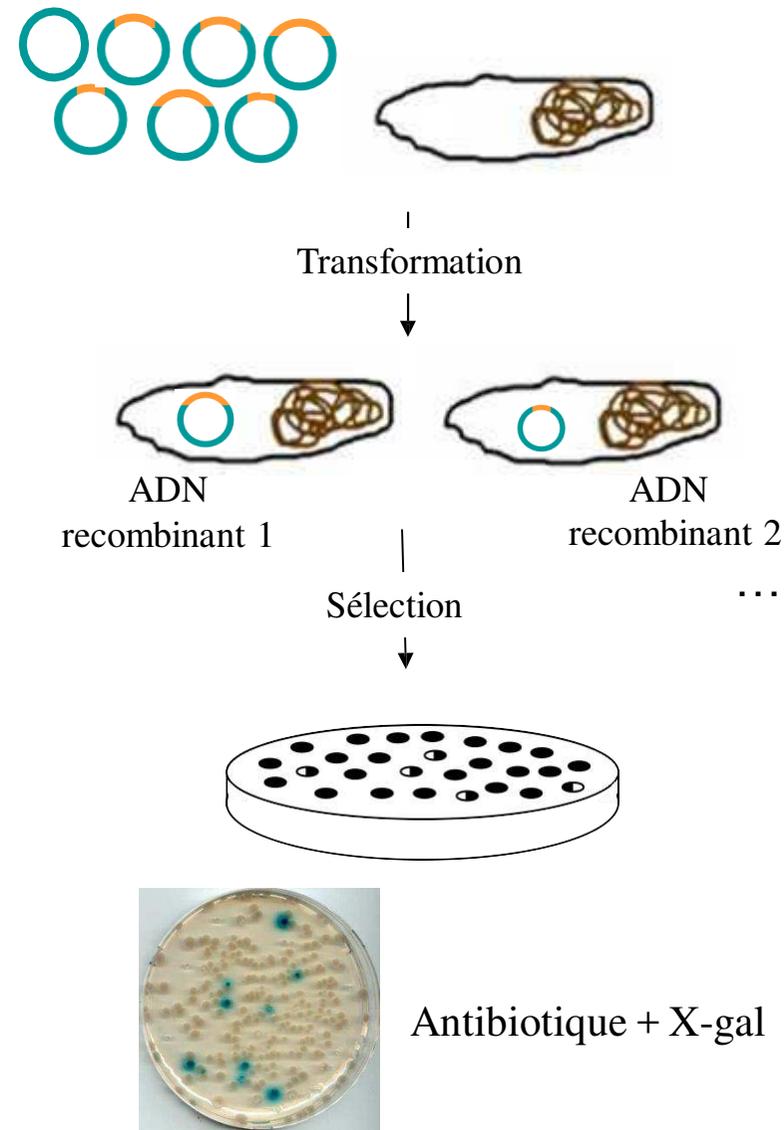


Construction d'une banque d'ADN génomique

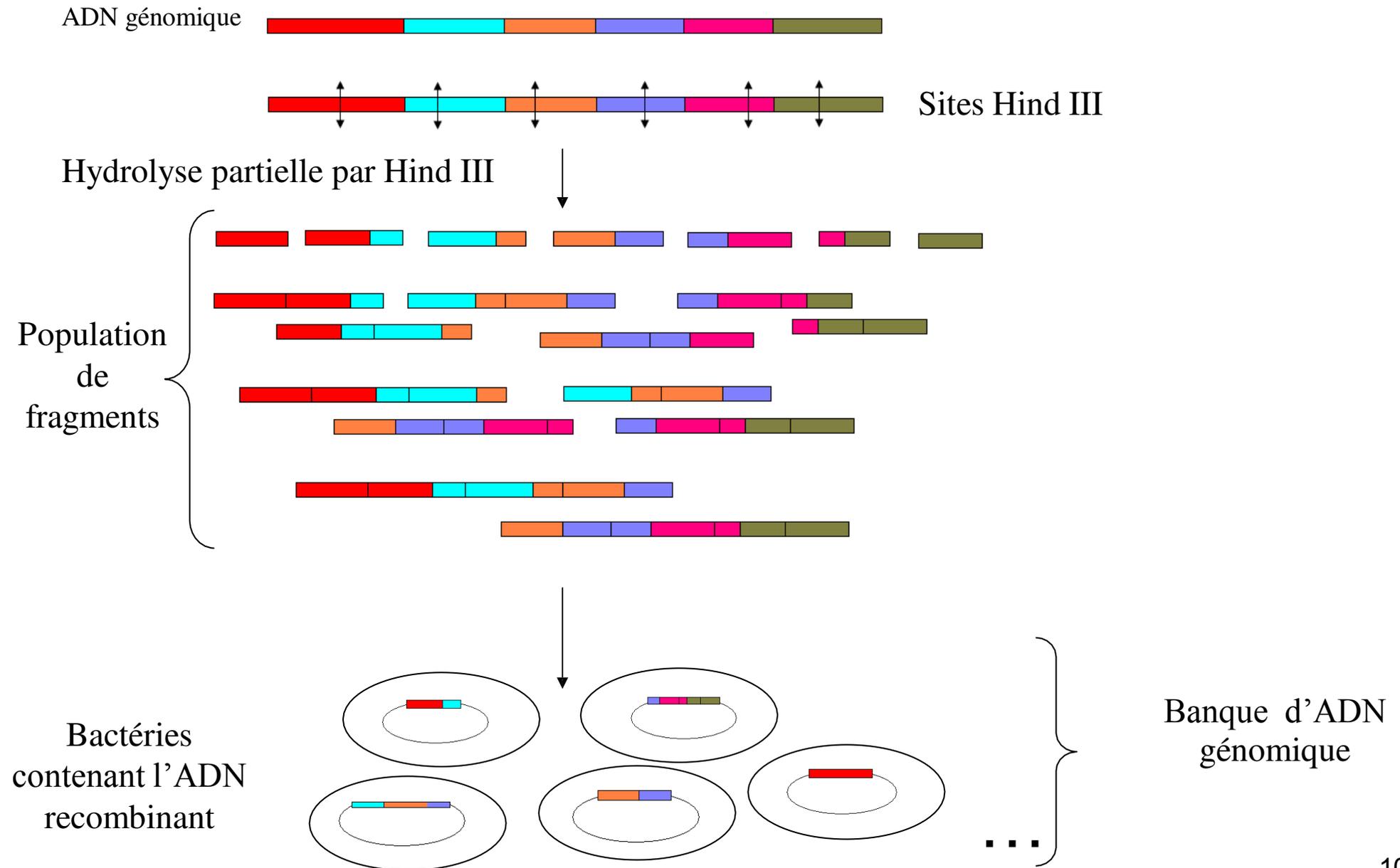
Deuxième étape :

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).



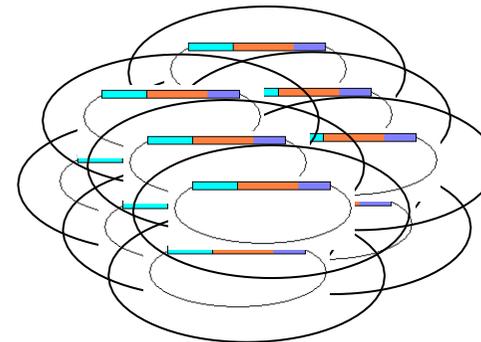
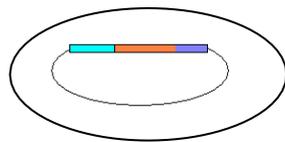
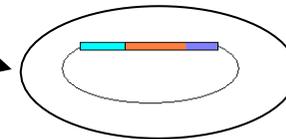
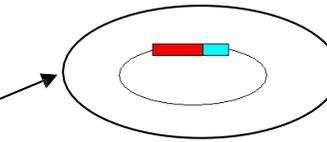
Construction d'une banque d'ADN génomique



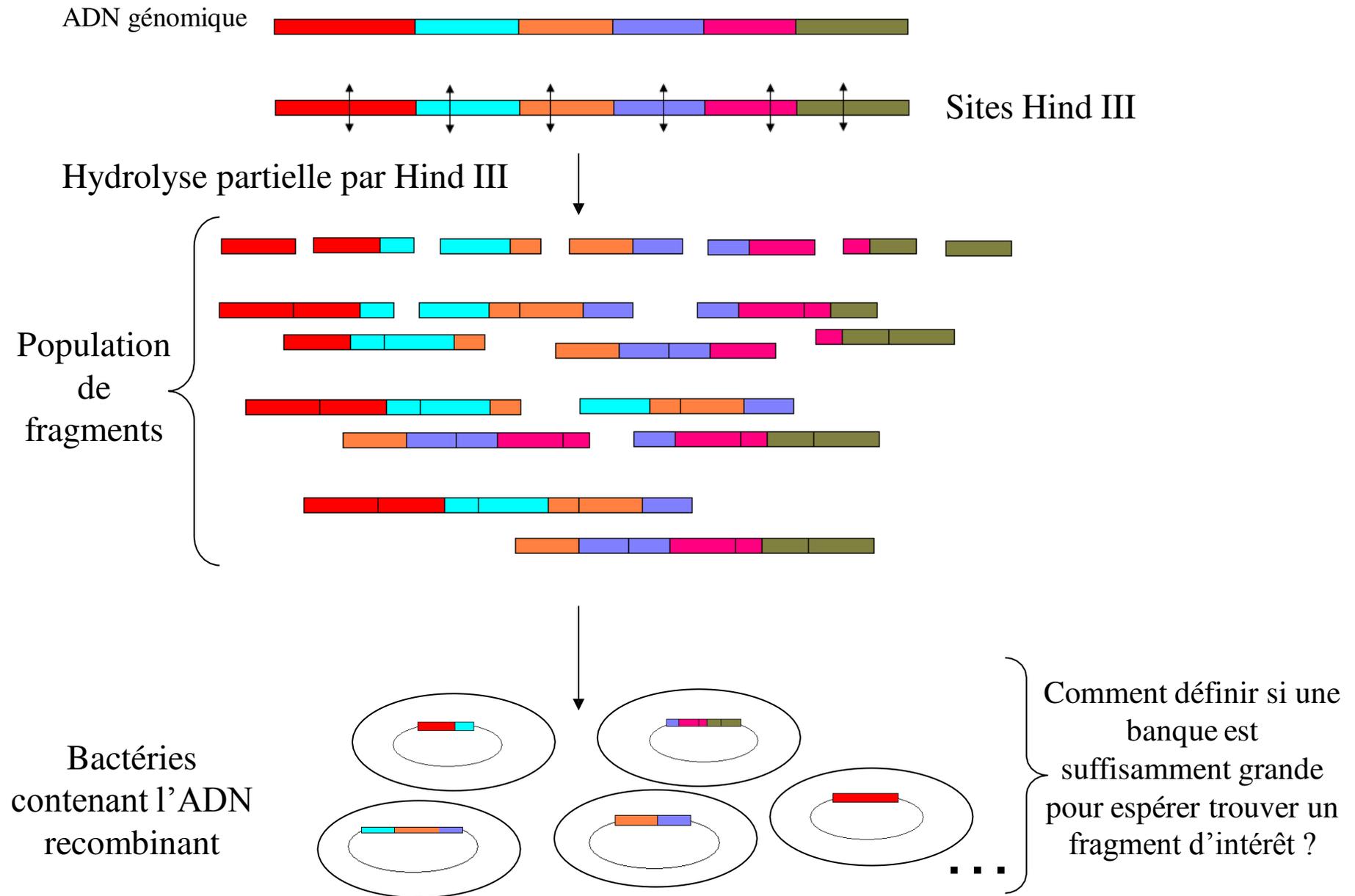
Construction d'une banque d'ADN génomique

Chaque colonie contient le même fragment ADN

et chaque colonie contient un seul type d'ADN recombinant

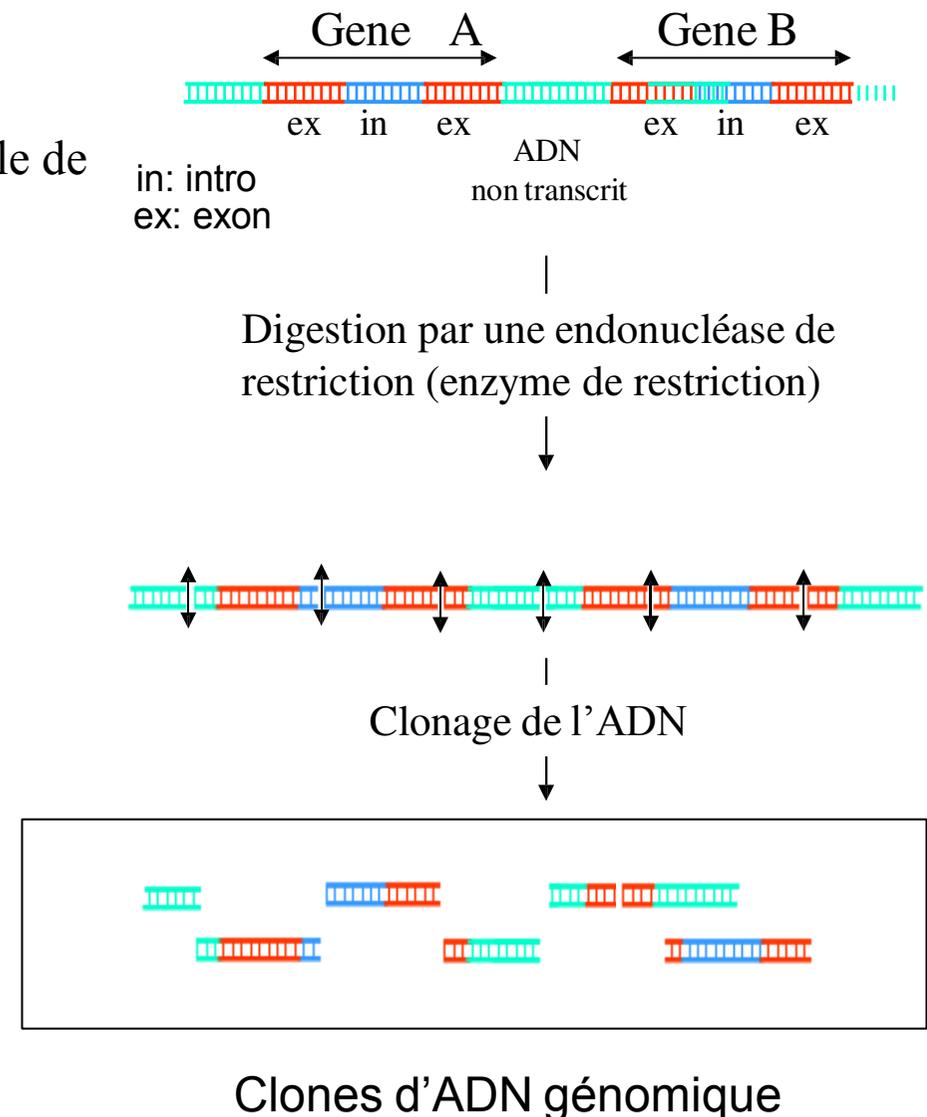


Construction d'une banque d'ADN génomique



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 (l'homme) 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.



Démarches à suivre afin d'isoler un gène

Objectif: Détecter parmi un grand nombre de bactéries ayant acquis un ADN recombinant celle qui contient le fragment d'ADN recherché. Dans notre exemple c'est rechercher la bactérie qui contient le fragment d'ADN portant le gène *Ghr-1*.

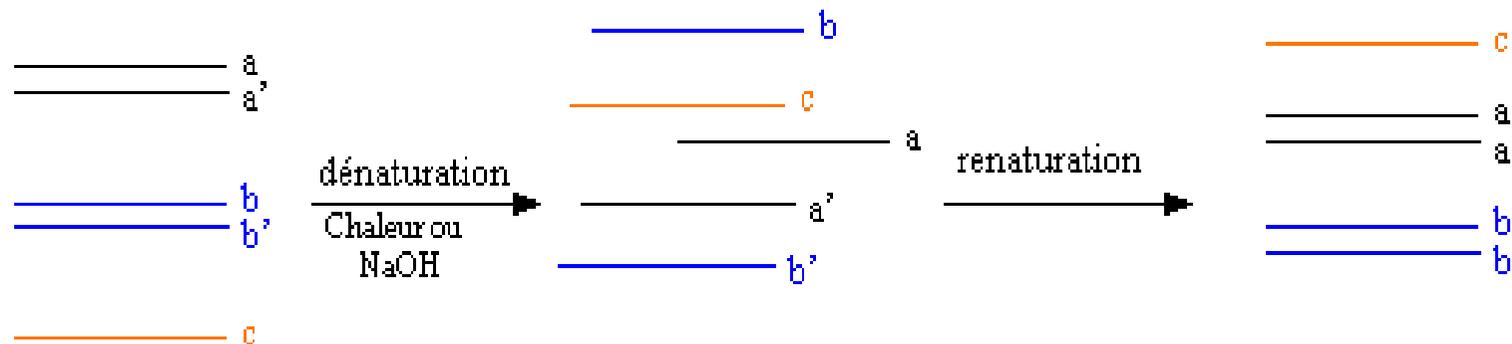
Principe général: utiliser une molécule marquée (radioactif ou phosphorescente) qui se fixe/s'**hybride** spécifiquement à la bactérie contenant l'ADN recombinant d'intérêt.

(voir prochain cours)

Dénaturation-renaturation ADN

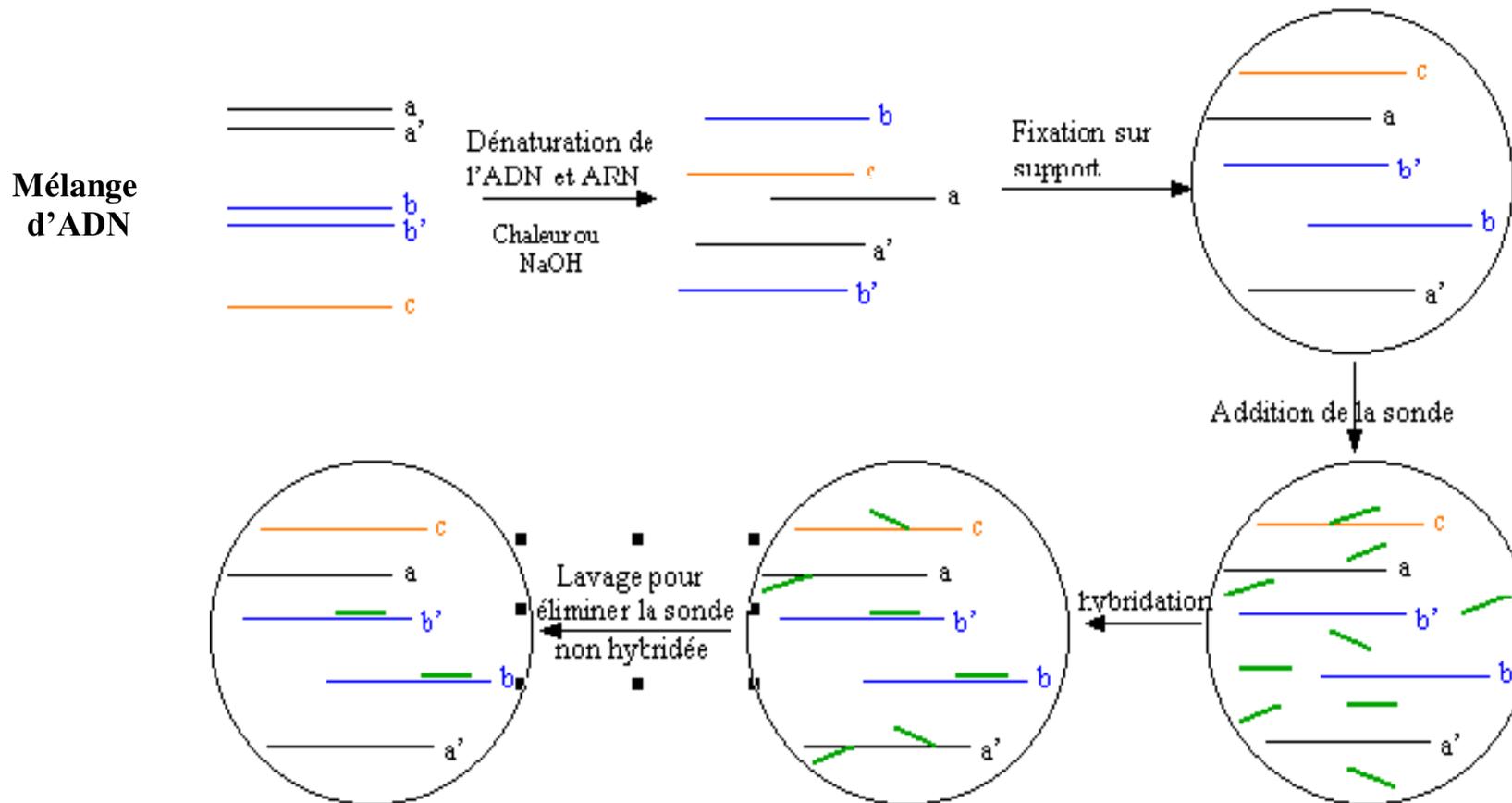
Principe: Deux étapes successives

- **Dénaturation:** séparation des brins d'ADN double brins de séquences différentes par rupture des liaisons hydrogènes (température > T_m ou pH > 12)
- **Renaturation:** réassociation spécifique (conditions favorables de température et pH) → hybridation des ADNs simples brins pour former les homoduplex originels.



(a,a'), (b,b') = séquences double brin complémentaires

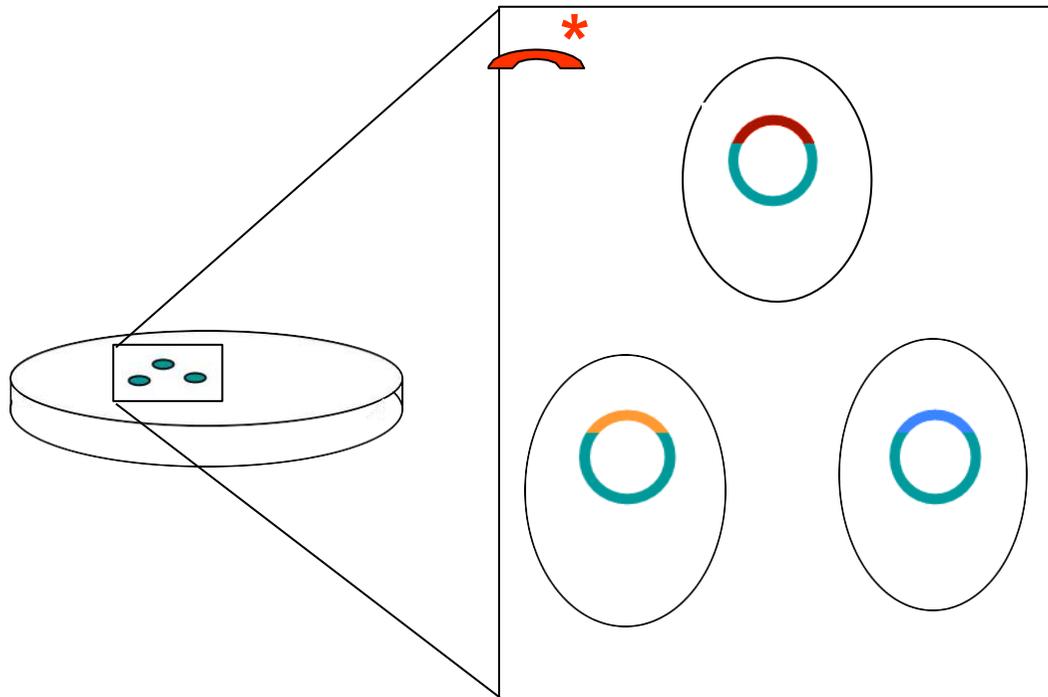
Principe d'hybridation et de détection des acides nucléiques



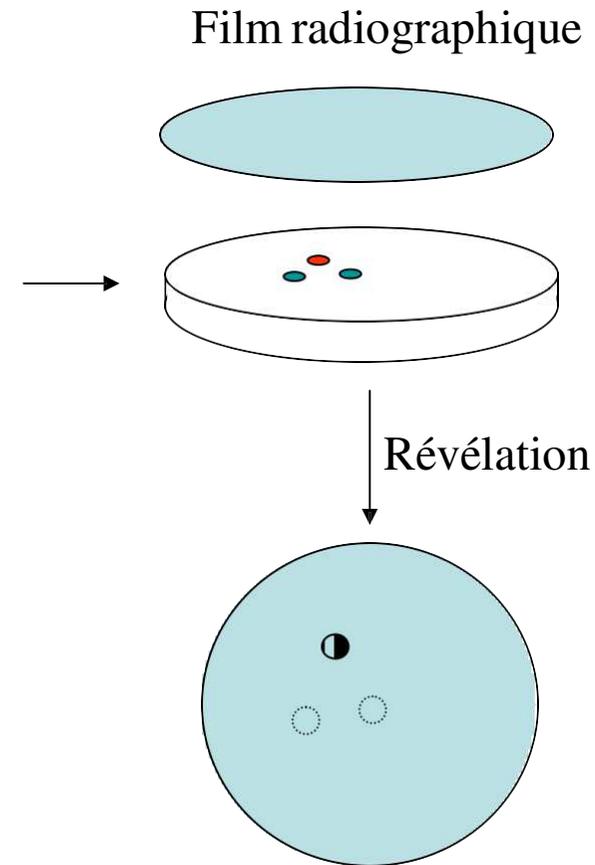
-Les brins peuvent se renaturer entre eux, mais peuvent aussi **s'hybrider avec une sonde marquée** s'il y a complémentarité.

-**Températures d'hybridation et de lavage** doivent être inférieures à la T_m de la sonde (≈ 5 à 10°C) \longrightarrow favoriser et conserver l'association de la sonde sur sa cible et défavoriser les mésappariements de la sonde avec une séquence homologue (stringence).

Principe de l'hybridation *in situ* sur colonies de bactéries

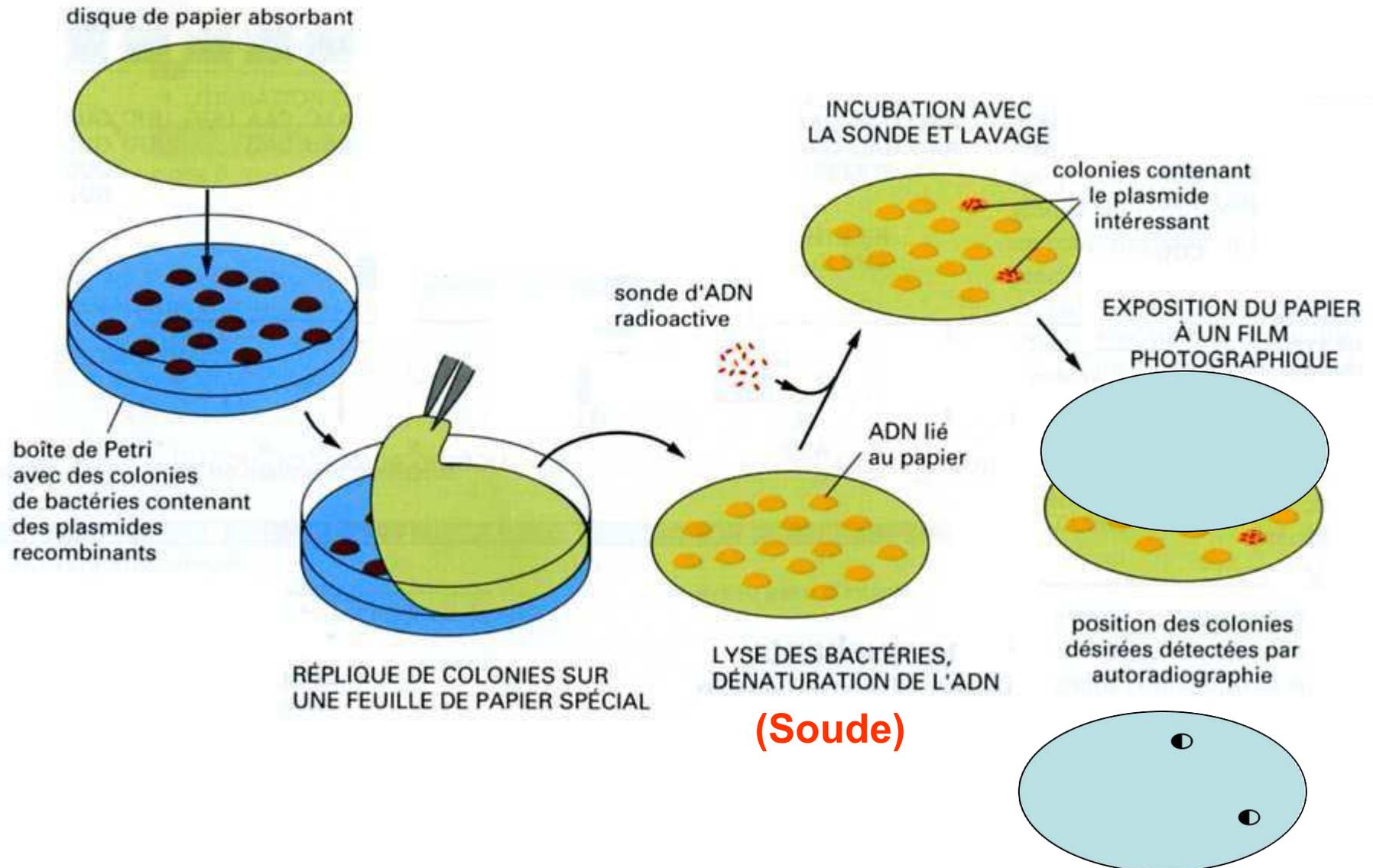


Hybridation de la sonde marquée radioactivement uniquement sur l'ADN cible (complémentarité de séquence) **prochain cours**



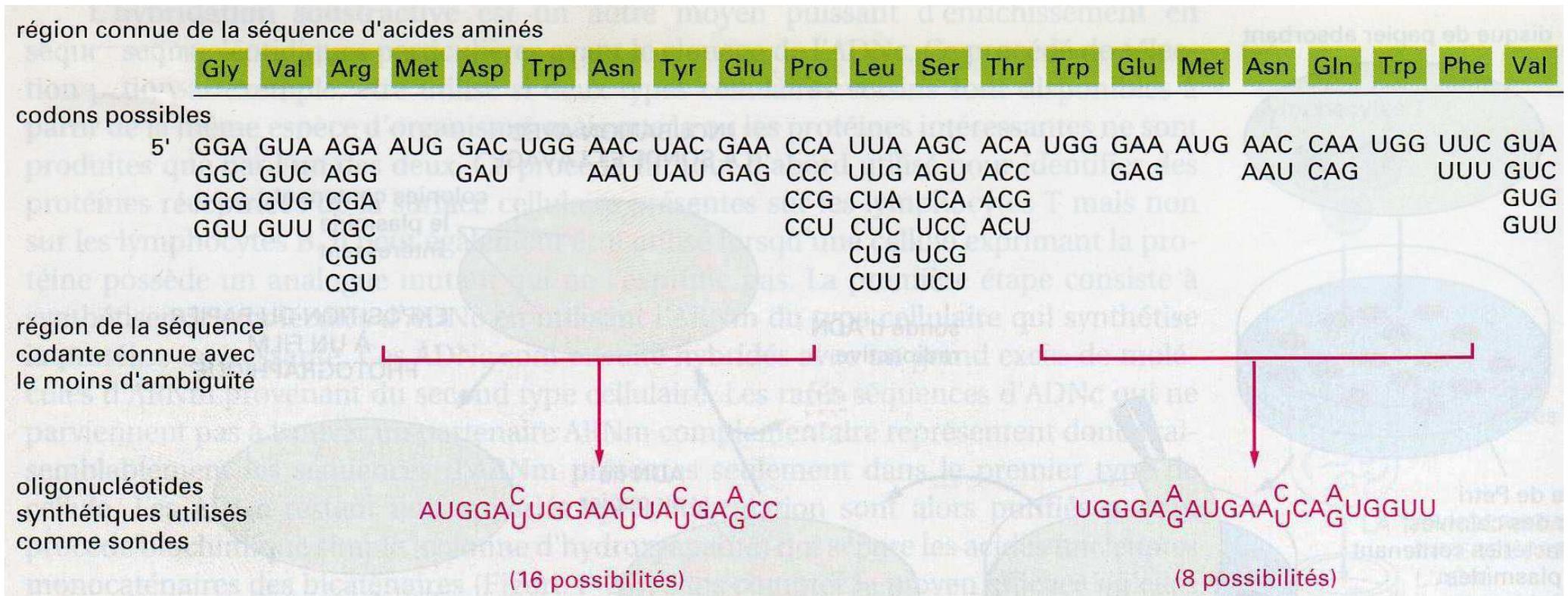
Seule la colonie qui a fixée la sonde radioactive va marquer le film (autoradiographie)

L'hybridation *in situ* sur colonies de bactéries



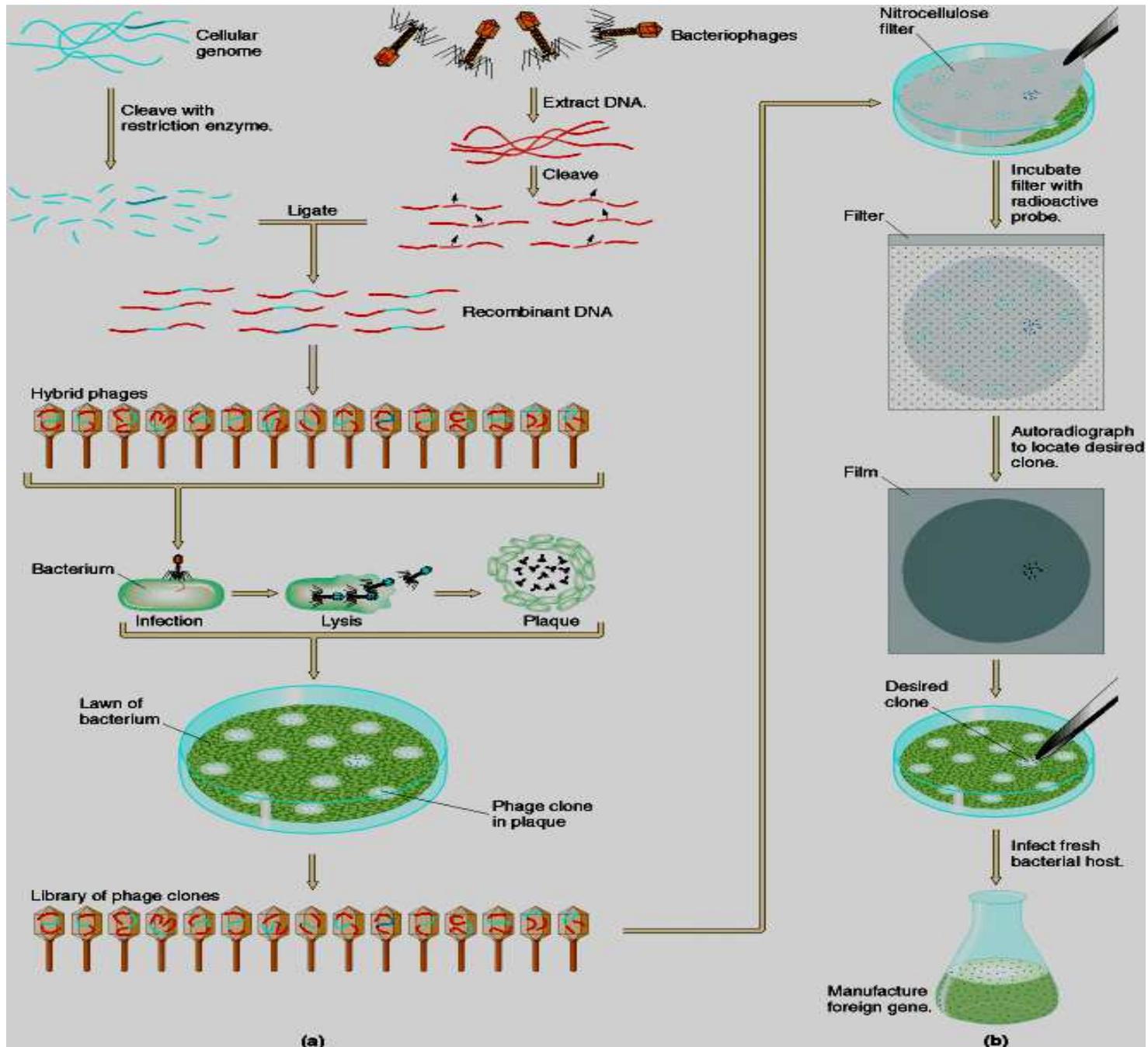
D'où vient la sonde ?

Problématique comment faire une sonde complémentaire quand on n'a pas la séquence ADN de la cible ?



On détermine les séquences possibles de l'ARNm et on utilise les régions les moins « variables » pour faire notre sonde

L'hybridation *in situ* sur plages de lyses

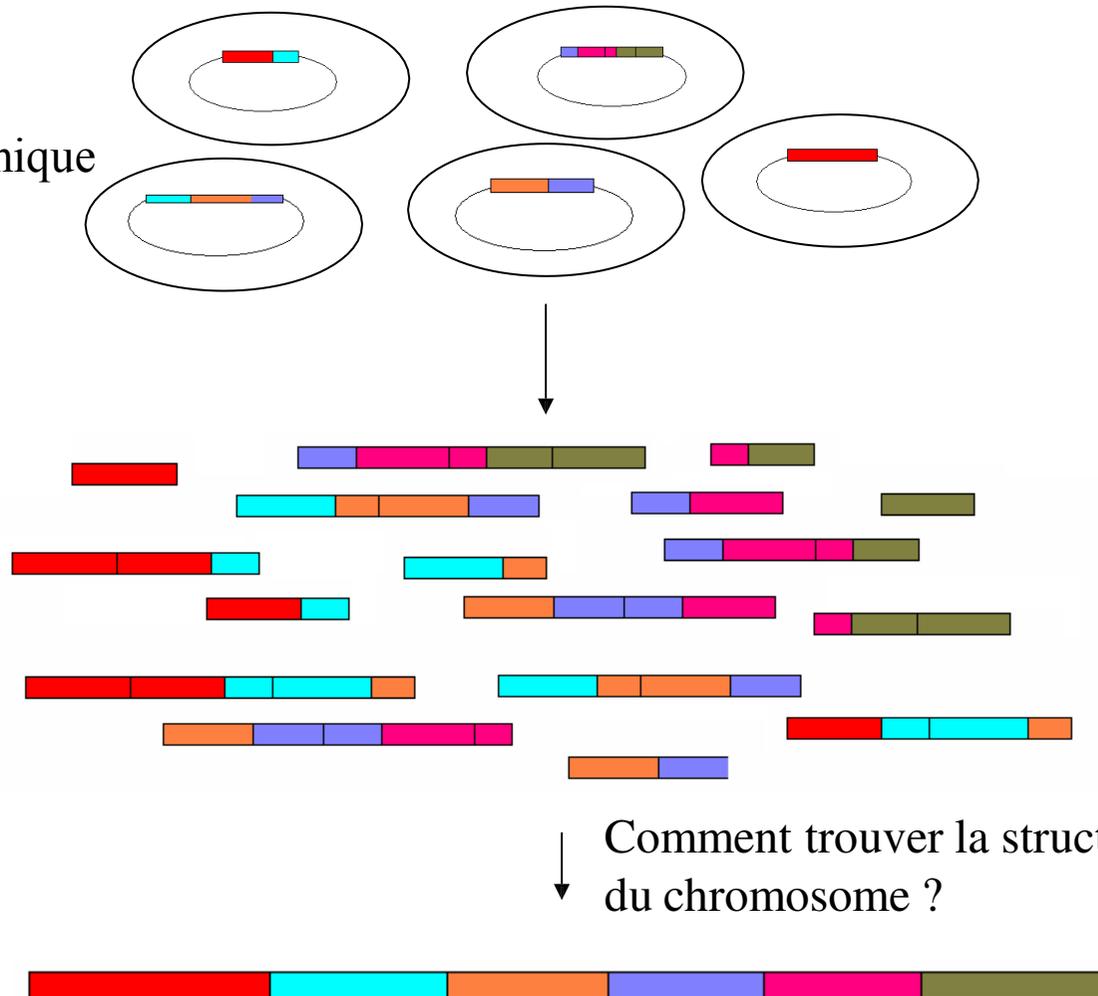


Intérêt des banques d'ADN génomique

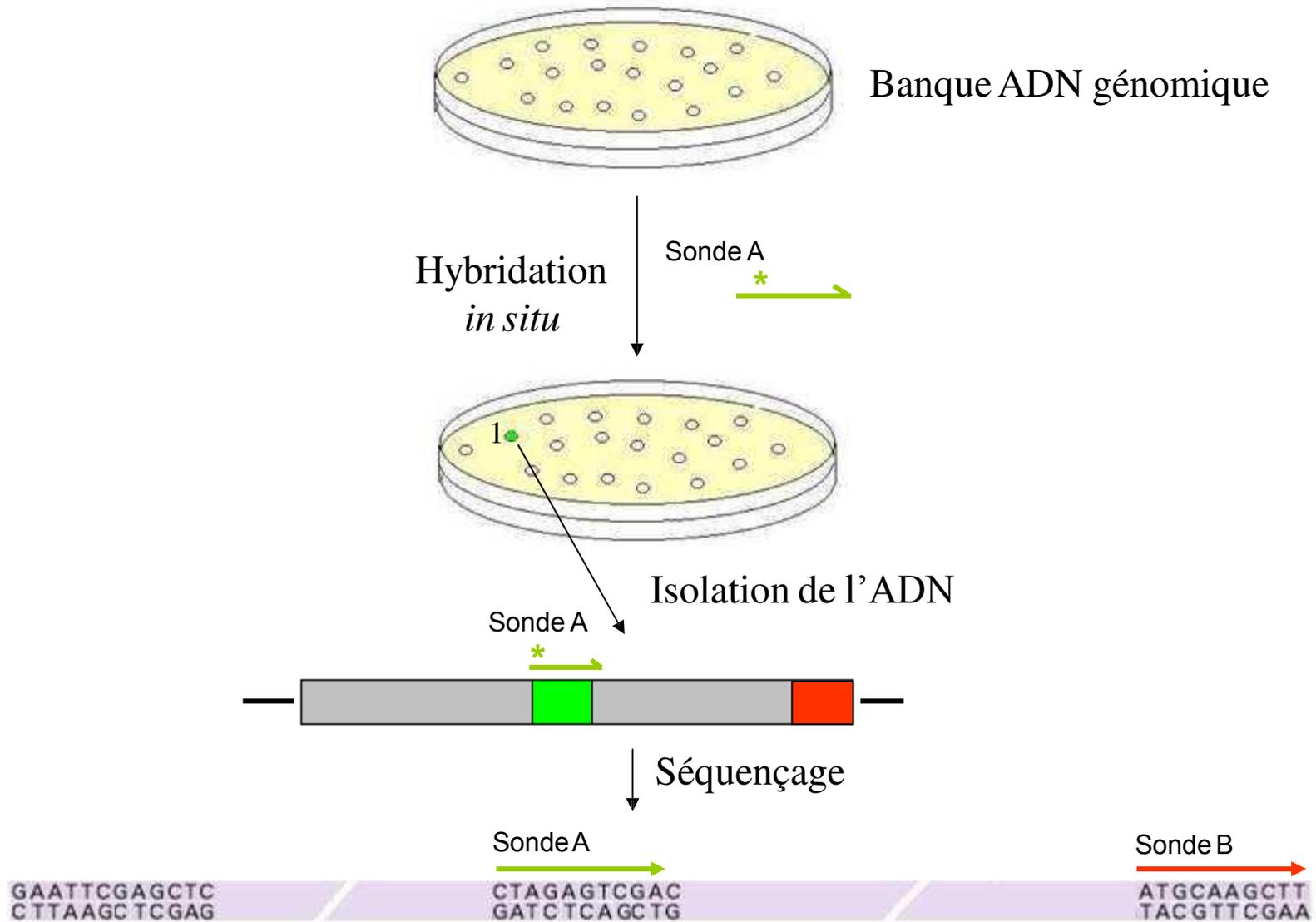
La marche sur le chromosome

Objectif: organiser les différents fragments de la banque pour reconstituer la structure initiale du chromosome

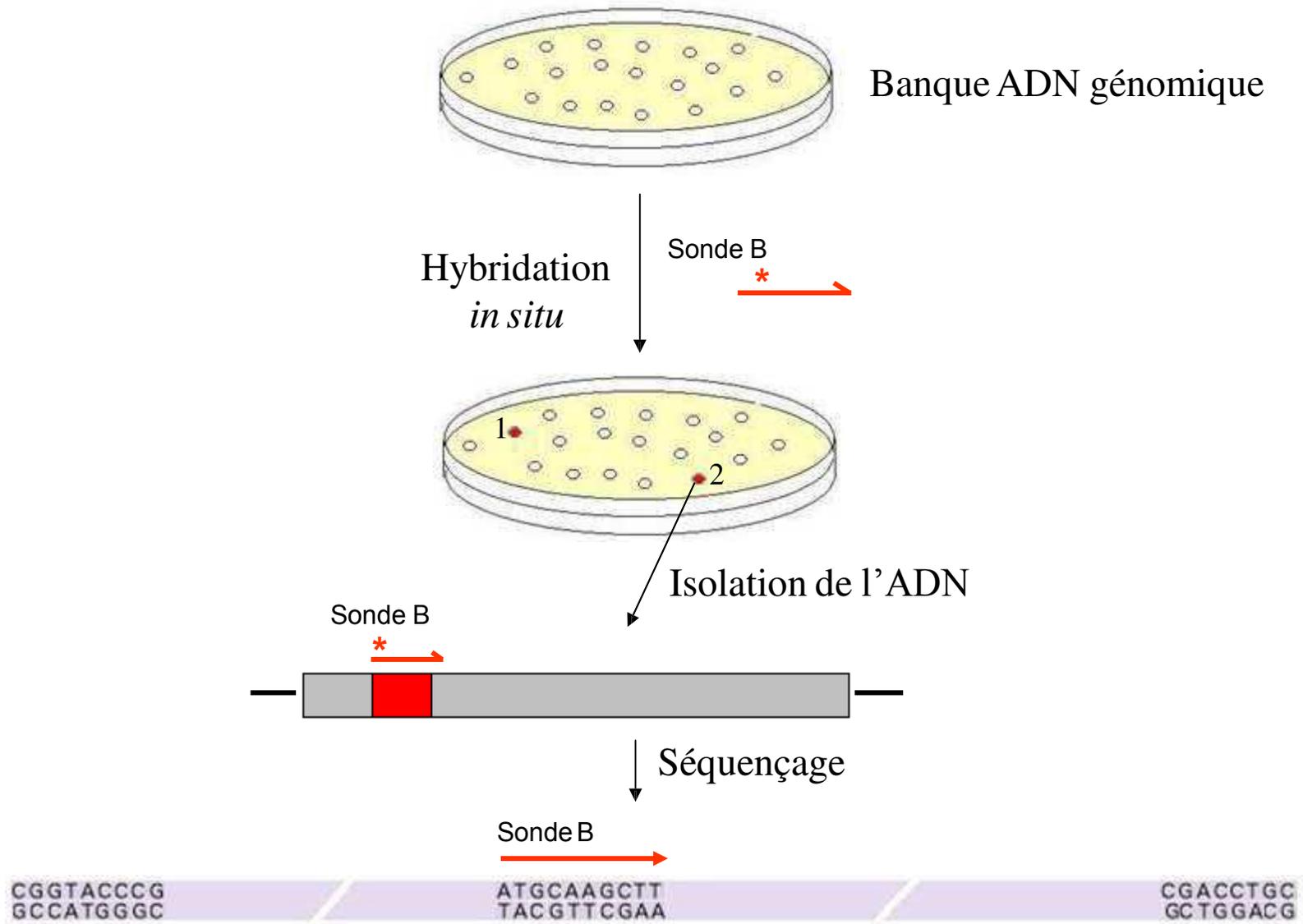
Banque d'ADN génomique



La marche sur le chromosome



La marche sur le chromosome



La marche sur le chromosome

On reconstitue l'ADN génomique de départ

Clone 1



Clone 2



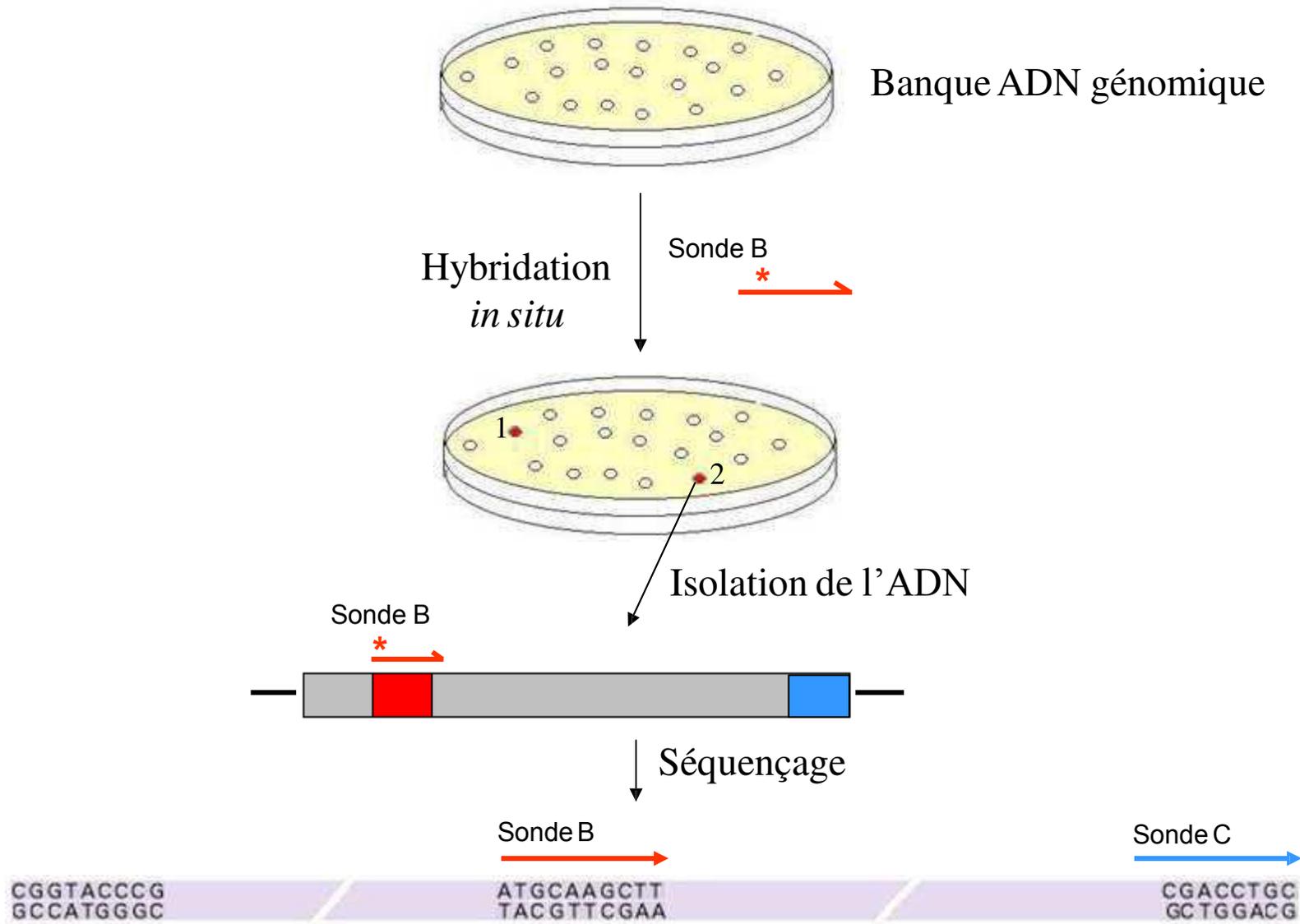
Assemblage



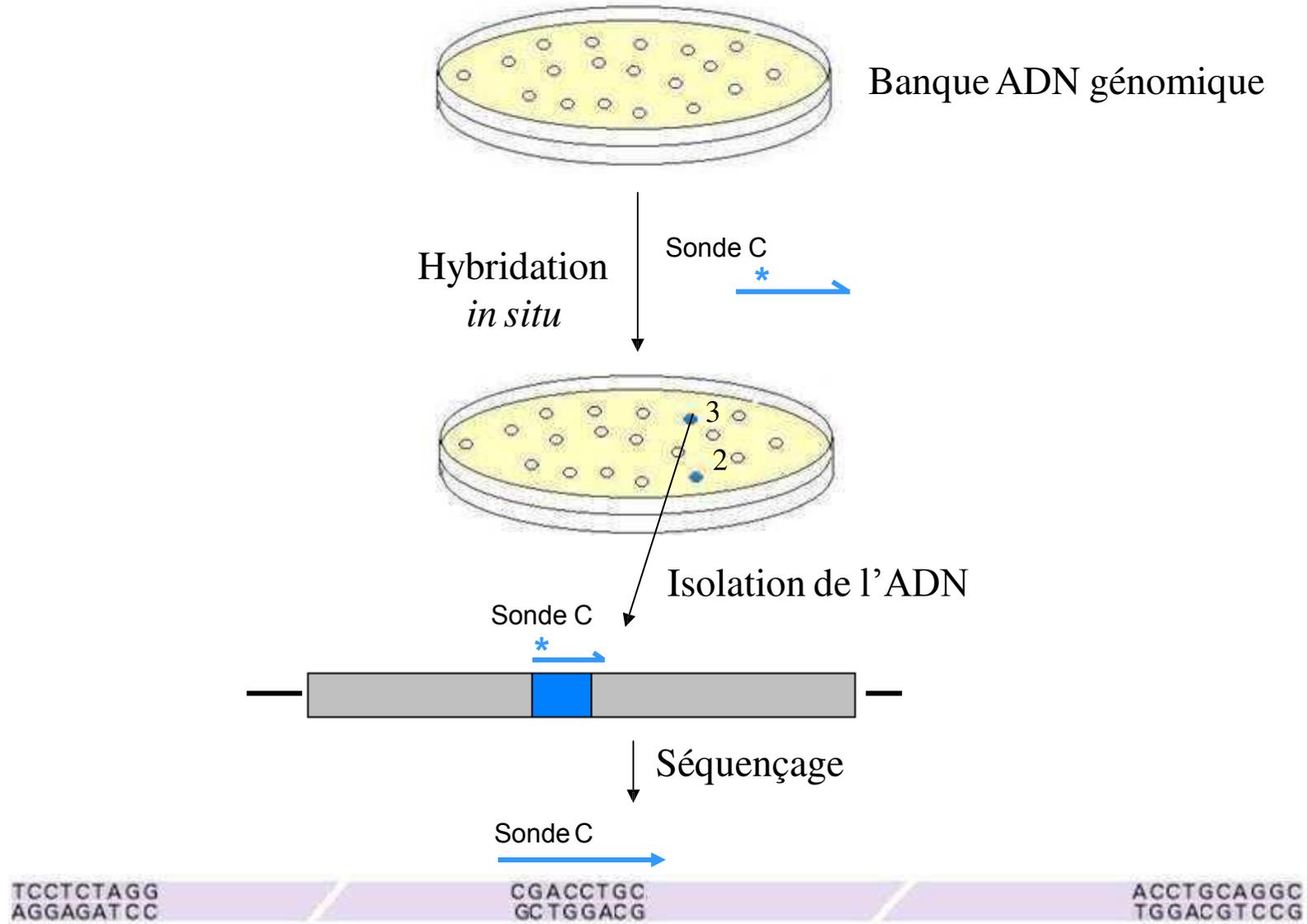
On a ordonné par chevauchement le fragment 1 (clone 1) et le fragment 2 (clone 2)

Pour faire du chevauchement il a fallu faire initialement une **hydrolyse partielle** du génome que l'on a cloné

La marche sur le chromosome



La marche sur le chromosome



La marche sur le chromosome

On reconstitue l'ADN génomique de départ

Clone 1



Clone 2



Clone 3



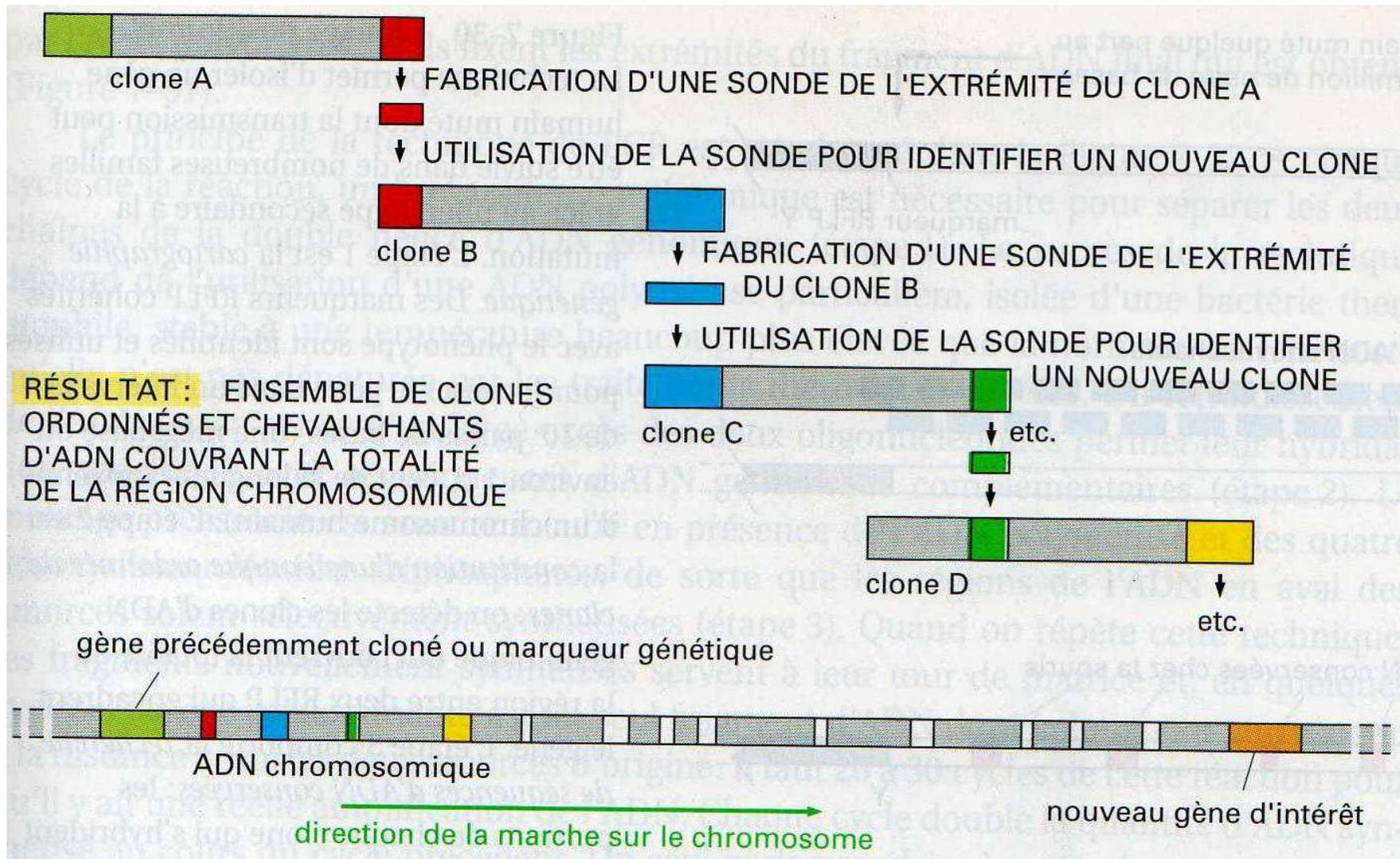
Assemblage



On a ordonné le fragment 1 (clone 1), le fragment 2 (clone 2) et le fragment 3 (clone 3)

La marche sur le chromosome

- Avec la méthode de marche sur chromosome on peut reconstituer l'organisation du chromosome



La marche sur le chromosome

Quelques limites de la marche sur le chromosome

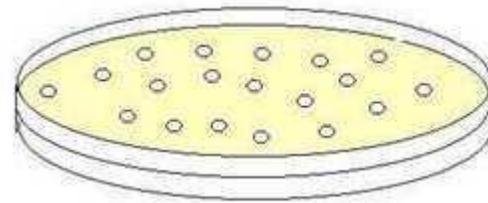
Le problème d'une telle démarche est que le clonage du premier fragment peut se faire dans n'importe quel sens et l'on ne sait pas à priori s'il faut partir à droite ou à gauche.

Cette méthode est longue et laborieuse: de l'ordre de 40 pas pour 10^6 bp. Pratiquement on ne parcourt guère plus de quelques kb par mois.

Si au cours de la marche on rencontre un fragment d'ADN répétitif, on ne peut aller plus loin puisqu'il n'y a alors plus de possibilité de sonde unique pour avancer

Séquençage des génomes

Technique pour obtenir la séquence de tout le génome ordonné d'un organisme



Banque ADN génomique

↙ On séquence l'ensemble des clones

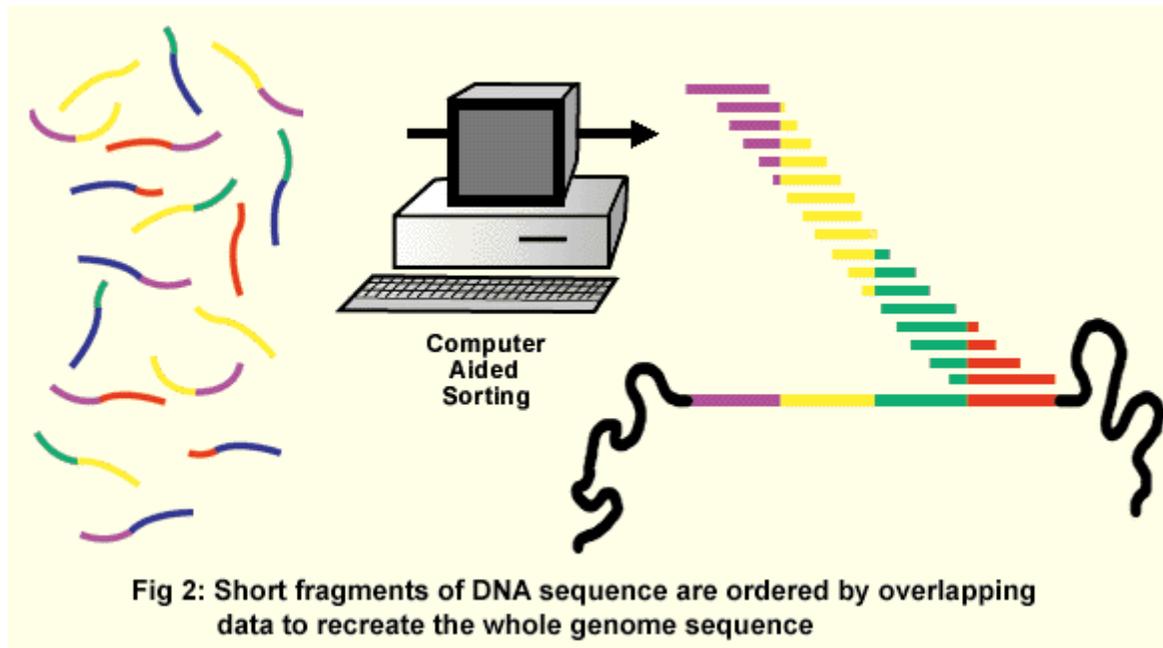


Fig 2: Short fragments of DNA sequence are ordered by overlapping data to recreate the whole genome sequence