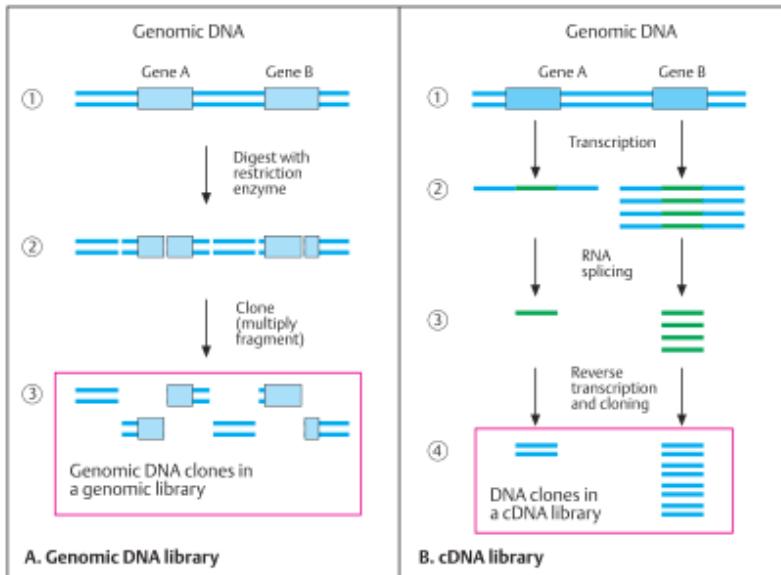


Bibliothèque d'ADN

Une bibliothèque d'ADN est une collection de fragments d'ADN qui représentent dans son ensemble le génome, c'est-à-dire un gène d'ADN particulier. C'est le point de départ pour le clonage d'un gène de localisation chromosomique inconnue. Pour produire une banque d'ADN, l'ADN total est digéré avec une enzyme de restriction et les fragments résultants sont incorporés dans des vecteurs et répliqués dans des bactéries. Un nombre suffisant de clones doit être présent au moins une fois. Ceci est une question de la taille du génome étudié et de la taille du fragment. Les plasmides et les phages sont utilisés comme vecteurs. Pour des fragments d'ADN plus grands, des cellules de levure peuvent être utilisées. Il existe deux types de bibliothèques: l'ADN génomique et l'ADNc.

Bibliothèque d'ADN génomique

Les clones d'ADN génomique sont des copies de fragments d'ADN de tous les chromosomes (1). Ils contiennent des séquences codantes et non codantes. Les enzymes de restriction sont utilisées pour cliver l'ADN génomique en plusieurs fragments. Ici, quatre fragments sont représentés schématiquement, contenant deux gènes, A et B (2). Ceux-ci sont incorporés dans des vecteurs, par exemple dans de l'ADN de phage, et sont répliqués dans des bactéries. La collection complète de molécules d'ADN recombinant, contenant toutes les séquences d'ADN d'une espèce ou d'un individu, est appelée une bibliothèque génomique. Pour trouver un gène particulier, une procédure de dépistage est nécessaire (voir B).



ADN génomique et bibliothèque d'ADNc

Bibliothèque d'ADNc

Contrairement à une bibliothèque génomique, qui est complète et contient de l'ADN codant et non codant, une bibliothèque d'ADNc se compose uniquement de séquences d'ADN codantes. Cette spécificité offre des avantages considérables par rapport à l'ADN génomique. Cependant, il nécessite que l'ARNm soit disponible et ne donne pas d'informations sur la structure du gène. L'ARNm peut être obtenu uniquement à partir de cellules dans lesquelles le gène respectif est transcrit, c'est-à-dire dans lequel l'ARNm est produit (1). Chez les eucaryotes, l'ARN formé pendant la transcription (transcription primaire) subit un épissage pour former l'ARNm. L'ADN complémentaire (ADNc) est formé à partir de l'ARNm par l'enzyme transcriptase inverse (3). L'ADNc peut servir de matrice pour la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire, de sorte qu'un ADN double brin complet peut être formé (clone d'ADNc). Sa séquence correspond aux séquences codantes des exons du gène. Ainsi, il est bien adapté pour une utilisation en tant que sonde (sonde d'ADNc). Les étapes suivantes, l'incorporation dans un vecteur et la réPLICATION dans des bactéries, correspondent à celles de la procédure pour

produire une banque génomique. les clones d'ADNc ne peuvent être obtenus qu'à partir de régions codantes d'un gène actif (producteur d'ARNm); ainsi, les clones d'ADNc de différents tissus diffèrent selon l'activité génétique. Puisque les clones d'ADNc correspondent aux séquences codantes d'un gène (exons) et ne contiennent pas de sections non codantes (introns), l'ADNc clone est le matériau de départ préféré lorsque des informations supplémentaires sur un produit génique sont recherchées en analysant le gène. La séquence d'acides aminés dans une protéine peut être déterminée à partir d'ADNc cloné et séquencé. De même, de grandes quantités d'une protéine peuvent être produites en ayant le gène clone exprimé dans des bactéries ou des cellules de levure.

Dépistage d'une bibliothèque d'ADN

Les bactéries qui ont absorbé les vecteurs peuvent se développer sur une boîte de Pétri enduite d'agar, où elles forment des colonies (1). Une réplique empreinte de la culture est prise sur une membrane (2), et l'ADN qui adhère à la membrane est dénaturé avec une solution alcaline (3). L'ADN du segment de gène recherché peut ensuite être identifié par hybridation avec une sonde marquée radioactivement (ou autrement) (4). Après l'hybridation, un signal apparaît sur la membrane au site du segment de gène (5). L'ADN complémentaire de la sonde marquée est localisé ici; sa position exacte dans la culture correspond à celle du signal sur la membrane (6). Une sonde est prélevée dans la zone correspondante de la culture (5). Il contiendra le segment d'ADN désiré, qui peut maintenant être encore répliqué (cloné) dans les bactéries. Par ce moyen, le segment désiré peut être enrichi et est disponible pour des études ultérieures.