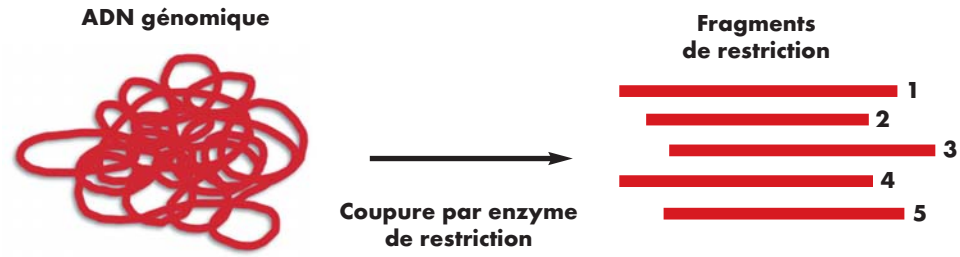
Le Clonage

1

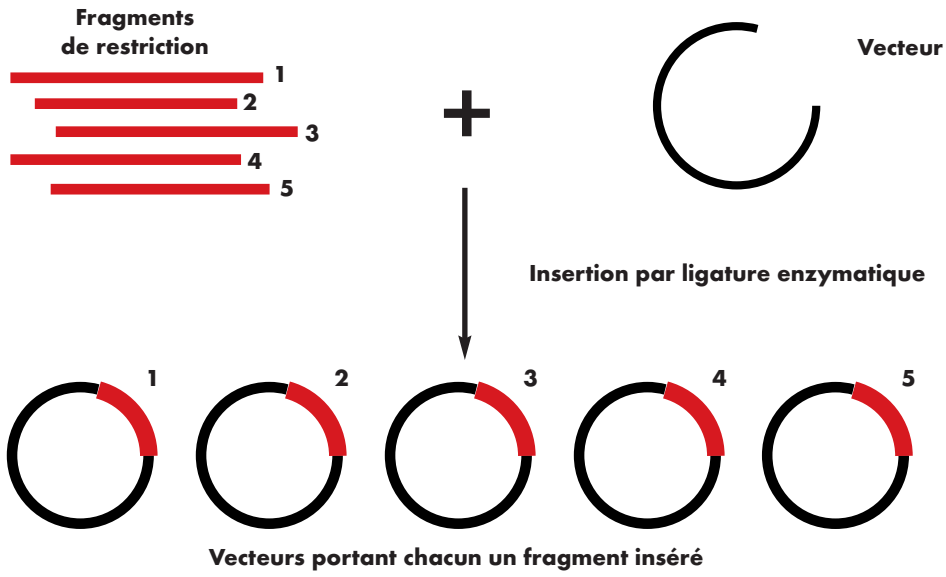
La lecture des séquences se fait essentiellement sur de petits fragments d'ADN, longs de 1 000 à 3 000 nucléotides. Les molécules d'ADN extraites de cellules de l'organisme étudié ont une taille trop importante pour être directement manipulables et séquençables. Pour séquencer un génome entier ou un grand fragment de génome, on doit donc constituer au préalable une collection ou **banque** de tels petits fragments d'ADN. Il est crucial que la totalité du génome ou du grand fragment à séquencer soit représentée dans les petits fragments de cette collection.

La première étape du séquençage consiste donc à fragmenter les grandes molécules d'ADN en morceaux plus petits qui seront ensuite séquencés. Cette découpe s'opère à l'aide de "ciseaux" à ADN (des enzymes de restriction) qui coupent chaque molécule de départ en fragments de taille choisie.



Ces fragments sont ensuite insérés, grâce à une autre enzyme (ligase), dans de petites molécules d'ADN circulaires qui vont servir de vecteurs pour les propager dans des bactéries.

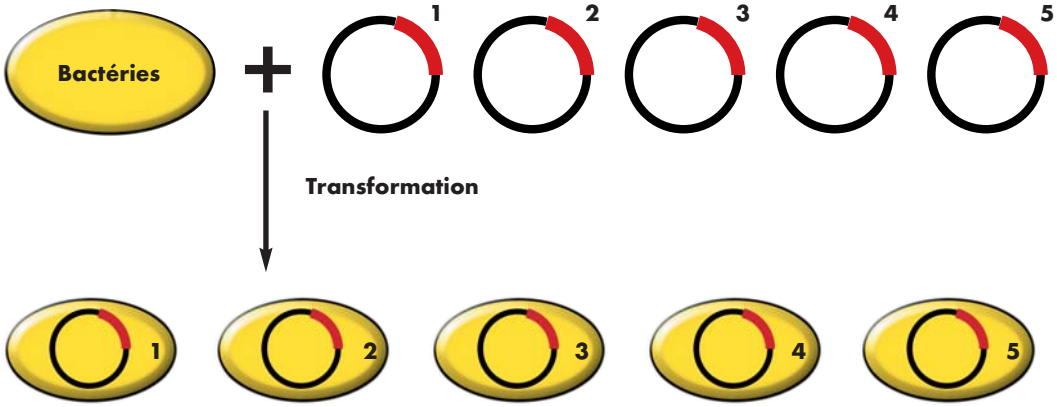
(suite au dos)



Le Clonage (suite)

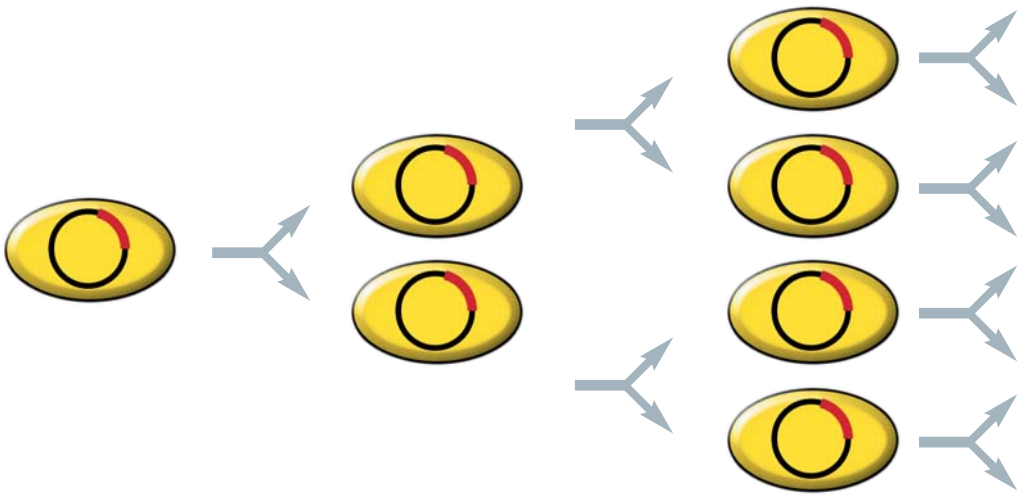
1

Pour introduire les vecteurs dans les bactéries, on "perméabilise" ces dernières de façon transitoire. En travaillant avec un large excès de bactéries perméabilisées, on s'assure qu'une bactérie recevra, au plus, un seul fragment d'ADN.



Clones bactériens contenant chacun un vecteur avec un fragment inséré

Chaque cellule bactérienne va ensuite se multiplier et le couple vecteur-fragment qu'elle contient est transmis à toutes ses descendantes. Ces cellules forment bientôt une colonie sur la boîte de culture : il s'agit d'un **clone** (les clones bactériens sont le résultat naturel de la division des bactéries ; l'opération de **clonage moléculaire** n'a donc rien à voir avec les efforts pour cloner, par transfert de noyaux dans des ovules, divers mammifères).



Propagation du vecteur avec son fragment dans les cellules bactériennes en phase de multiplication

Cette manipulation permet donc d'isoler dans un clone bactérien un fragment d'ADN de n'importe quelle origine et d'assurer sa propagation indéfiniment. Chacun des clones bactériens peut aussi être cultivé en masse et servir à préparer une grande quantité du fragment cloné en vue du séquençage. Par extension, on nomme parfois clone le fragment d'ADN lui-même.