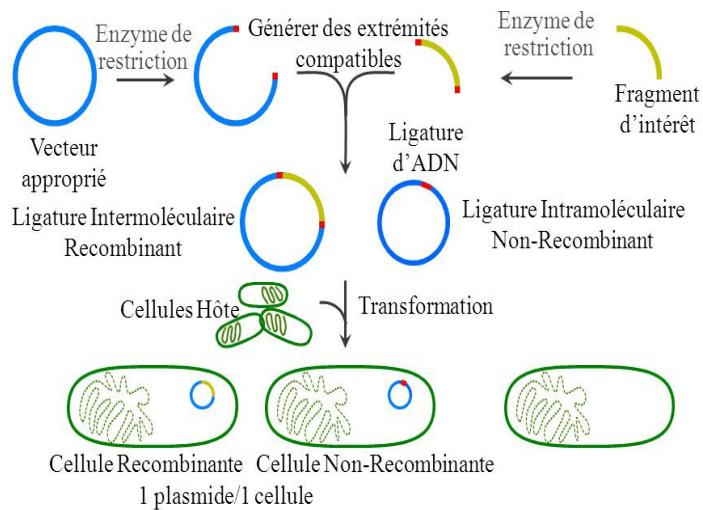


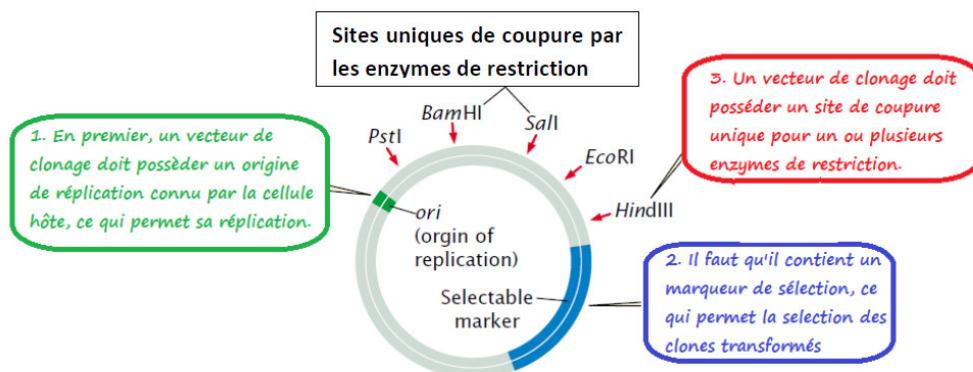
Introduction (principe du clonage)



I. Les vecteurs

Un vecteur de clonage est une molécule (matériel génétique) qui peut intégrer un ADN étranger pour permettre son transfert et amplification dans une cellule hôte. La structure typique d'un vecteur de clonage comprend :

- une origine de réplication pour assurer la multiplication autonome du vecteur
- une série de sites uniques de restriction (région à sites multiples de clonage : MSC ou polylinker)
- un ou deux marqueurs de sélection (confèrent la résistance à des antibiotiques par exemple).



1. Les plasmides

Sont des petites molécules d'ADN bicaténaire extrachromosomique habituellement circulaire (bactéries et quelques levures et mycètes). Ils portent un nombre de gènes réduit (résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, production de toxines...).

Le plasmide pBR322

- la séquence nucléotidique est complètement connue.
- sa production peut être portée à 1000 à 3000 copies par cellule.
- Possibilité d'y insérer un grand fragment d'ADN sans toutefois dépasser la taille de 10kpb.
- deux gènes de résistances aux antibiotiques : l'ampicilline (ApR) et la tétracycline (TcR).
- vingt sites uniques pour des enzymes de restriction.

Le plasmide pUC18/19 (plasmides de seconde génération)

Est un plasmide pBR de taille plus petite dans lequel on a remplacé le gène de résistance à la tétracycline par une partie du gène lac Z dans lequel a été introduit un site multiple de clonage (Polylinker).

2. Les phages

Un bactériophage, ou phage, est un virus infectant les bactéries autorisent le clonage de fragments d'ADN très grands (environ de 22kb).

Le bactériophage λ

- est un virus d'*E. coli*, à ADN linéaire double brin.
- A chaque extrémité 5' se trouve une région monocaténaire de 12 nucléotides (séquences **cos**), l'une complémentaire de l'autre.
- L'association de ces extrémités **cohésive naturelles** forme le site cos [*cos*: éléments importants pour la réplication et l'encapsidation de bactériophage λ].
- Il a une capacité d'infection de l'hôte (transfection) très rapide et le nombre de copies par cellule étant considérable en comparaison avec les plasmides.

Le phage M13

Il a un ADN simple brin. Il rentre dans les cellules par les pili sexuels. Quand l'ADN est rentré, il passe en double brin circulaire puis commence à se répliquer comme un plasmide mais la réplication devient continue sur un seul brin. On obtient des ADN simples brins qui seront empaquetés et qui sortiront de la cellule. Ce phage accepte de plus gros fragment d'ADN : on peut rajouter des sites de clonage multiple (MCS).

3. Système hybride

3.1. Les cosmides

Des vecteurs artificiels constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutées les séquences **cos** du phage λ . Ces vecteurs rassemblent à la fois les propriétés intéressantes des **plasmides** comme l'origine de réplication et les gènes de résistance et celles du bactériophage : encapsidation *in vitro* de grand fragment d'ADN.

3.2. Le phagémide : plasmide qui contient l'origine de réplication de M13. Ici, M13 est helper : il sert surtout à produire les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN simple brin et le packaging de l'ADN simple brin dans les particules du phage.

3.3. Les YAC (yeast artificial chromosome) ou chromosomes artificiels : sont des segments d'ADN qui contiennent tous les éléments requis pour la propagation d'un chromosome chez la levure : une origine de réplication, le centromère (nécessaire à la ségrégation des chromatides dans les cellules), les télomères (pour la réplication des extrémités du chromosome), un site Polylinker et un marqueur de sélection.

II. Le clonage

Les étapes du clonage sont :

- Isolement de l'ADN responsable d'un phénotype particulier (ADN d'intérêt, donneur, cible, étranger, exogène)
- Jonction de ce fragment d'ADN (insert) à un vecteur
- Introduction dans une cellule hôte pour propagation (transformation)
- Sélection de la séquence désirée

1. Préparation de l'ADN d'intérêt et du vecteur

- Le vecteur de clonage est coupé par une enzyme de restriction à site unique (ouverture ou linéarisation).
- L'ADN de l'organisme donneur est digéré par la **même enzyme** de restriction que celle utilisée pour la linéarisation du vecteur.

Les différents fragments obtenus (ADN cible et vecteur) possèdent donc à leurs extrémités une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction.

- Si le vecteur de clonage et l'ADN exogène n'ont pas été digérés par la même enzyme de restriction et ne possèdent pas d'extrémités compatibles, il est indispensable de créer des extrémités franches pour insérer l'ADN exogène dans le vecteur. Il s'agit par :

- action d'une ADN polymérase, de remplir les extrémités 5'-P grâce à son activité 5'3' polymérase.
- ou de polir les extrémités 3'-OH protubérantes grâce à l'activité 3'5' exonucléase de l'enzyme.
- La recircularisation du vecteur sur lui-même est empêchée par traitement à la **phosphatase alcaline**.

2. Jonction de l'ADN d'intérêt au vecteur

- Lorsque le plasmide ouvert et l'ADN étranger sont confrontés, il y a hybridation (formation de liaisons hydrogène) des extrémités cohésives complémentaires.
- Une ligase, permettant la ligature du fragment d'ADN étranger au plasmide (liaison covalente : 5'P-3'OH).
- Les bouts francs peuvent être réunis par la **T4 ligase**.
- Le plasmide obtenu, de nouveau circulaire, est dit **recombinant** s'il a intégré un **insert**.

3. La transformation

Après clonage, il faut intégrer le vecteur recombinant dans une cellule hôte afin de l'amplifier, de le purifier ou d'exprimer le gène qu'il contient. Le transfert de l'ADN dans une cellule hôte désigne la transformation.

Les méthodes de transformation sont :

- Méthodes chimiques : Calcium Phosphate, polymères cationiques...
- Méthodes physiques : choc thermique, électroporation, microinjection (cellules animales), laserfection, sonoporation.....
- Méthodes biologiques : infection par des virus..

• Etapes de la transformation

- Les cellules hôtes sont rendues compétentes (fragilisées) afin d'intégrer le vecteur recombinant (ex. par un traitement des bactéries au chlorure de calcium à 4 °C et les levures par une solution saline alcaline comme l'acétate de lithium) : méthode chimique
- La membrane plasmique est momentanément rendue perméable (formation transitoire de micropores) soit par un choc thermique, soit par un choc électrique (électroporation).
- Une cellule dans laquelle on a fait entrer un ADN (vecteur recombinant) est une cellule transformée (transfектée).

4. Les marqueurs de sélection (criblage)

4.1. Résistance aux antibiotiques : on utilise souvent des antibiotiques pour sélectionner les cellules hôtes transformées.

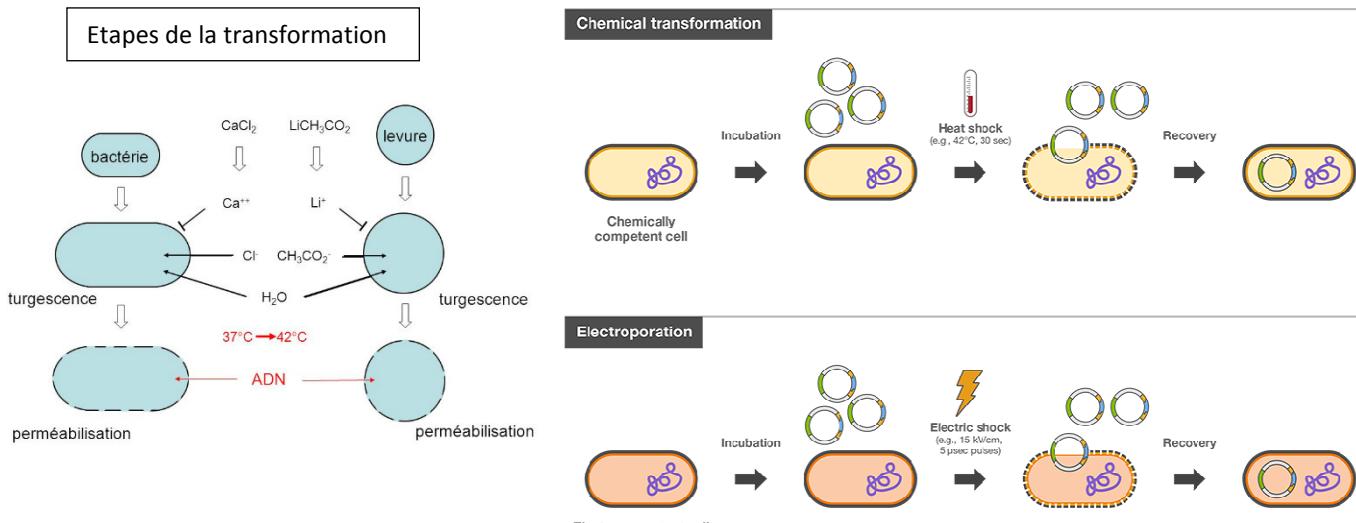
- Un premier criblage (par un premier antibiotique) s'opère à l'issue de la transformation. Toutes les cellules n'ayant pas intégré le gène de sélection (le vecteur) vont mourir.
- Il s'agit ensuite de distinguer les cellules comportant le gène d'intérêt de celles ayant intégré le vecteur non recombinant. On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique. L'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur doit inactiver le gène de résistance au deuxième antibiotique.
- Les bactéries transformées par les vecteurs recombinants sont donc résistantes au premier antibiotique et sensibles au deuxième antibiotique.

4.2. Criblage à l'aide du gène *lacZ*

Le gène *lacZ* code la β-galactosidase. Les cellules hôtes utilisées sont mutées dans ce gène et ne possèdent donc pas de β-galactosidase active. Le site multiple de clonage (polylinker) se trouve à l'intérieur du gène *lacZ*.

L'activité est restaurée quand la cellule est transformée avec un vecteur possédant *lacZ* intégrer. Cependant les cellules ayant intégré un vecteur recombinant perdront l'activité de la β-galactosidase et un test colorimétrique sur colonies permet directement de les identifier.

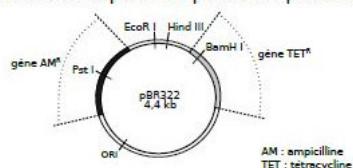
Il suffit d'étaler sur l'agar le substrat X-Gal (produit incolore). Les cellules qui se développent sur l'agar et qui possèdent une activité β-galactosidase libéreront le produit X de couleur bleu. Les colonies bleues correspondent ainsi aux cellules possédant un vecteur non recombinant (*lacZ* intégrer) alors que les colonies blanches possèdent un plasmide recombinant (gène *lacZ* interrompu).



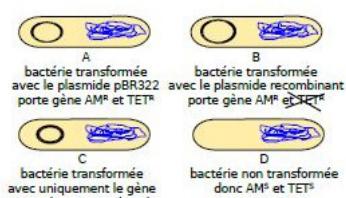
Criblage d'une souche transformée par un plasmide recombinant pBR322
le gène recombinant est inséré dans le gène Tétracycline^R du plasmide

Rappels :

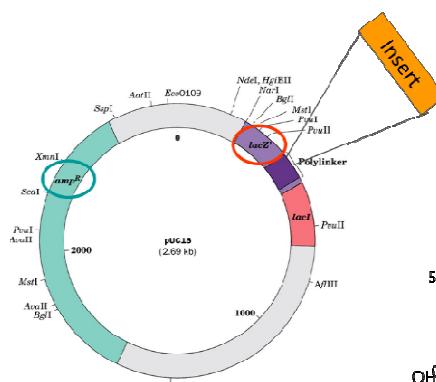
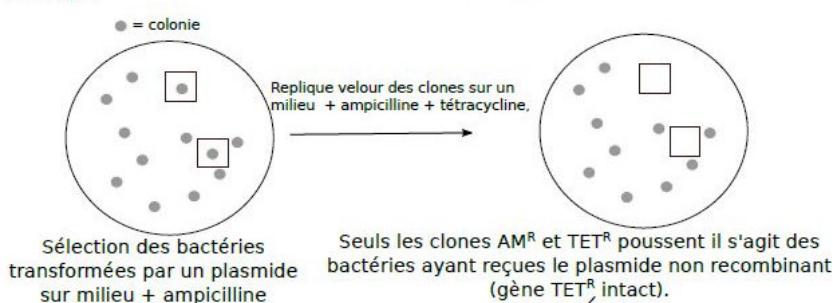
Schéma simplifié du plasmide pBR322



Les possibilités de transformation



Criblage :



lacZ' : fragment de β -galactosidase

