

Le clonage moléculaire

1. Définition

Si l'on s'en tient à une définition générale, le clonage consiste à obtenir plusieurs copies identiques d'un même élément de départ. Dans le cadre de biologie moléculaire, le clonage permet « d'amplifier » à l'identique un fragment d'ADN pour en obtenir une grande quantité.

Cloner un fragment d'ADN consiste à :

- isoler physiquement ce fragment.
- augmenter le nombre de copies (amplification)

2. Principe

Le clonage consiste à :

- 1) insérer un fragment d'ADN étranger à cloner (insert) dans un vecteur de manière à obtenir un vecteur recombinant.
- 2) introduire le vecteur recombinant dans une cellule hôte.
- 3) amplifier le vecteur recombinant par division de la cellule hôte, afin d'obtenir un clone recombinant (fig.1).

3. Vecteurs de clonage

Les vecteurs sont des petits ADN qui permettent le transfert de gènes vers un autre organisme.

3.1. Structure

Les vecteurs de clonage ont des caractéristiques communes, ils possèdent tous :

1. Une origine de réPLICATION : la séquence **ori**, qui leur permet de se répliquer de manière autonome ;
2. un (ou plusieurs) gène (s) de résistance aux antibiotiques pour la sélection ;
3. une région (*polylinker, site multiple de clonage (SMC)*) qui a la particularité de posséder des sites de restrictions uniques pour différentes enzymes. C'est dans cette région que sera inséré le fragment d'ADN à cloner et offre diverses possibilités de clonage (fig.2 et 3).

3.2. Plasmide

C'est le vecteur le plus couramment utilisé pour le clonage de l'ADN. Il existe naturellement dans les bactéries. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome bactérien), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal de cellule-hôte. Les gènes portés par les plasmides peuvent coder pour la synthèse de protéines qui confèrent des propriétés biologiques diverses : résistance aux antibiotiques. A partir de ses observations les biologistes moléculaires ont « construit » des plasmides de façon à contrôler leur expression et leur multiplication.

3.2.1. Classes de plasmides

a) Plasmides de première génération

Ce sont les premiers à avoir été utilisés en génie génétique. Ce sont des plasmides à l'état naturel, non modifiés au laboratoire. Il s'agit des plasmides suivants : ColE1, RSF 2124 et pSC 101.

b) Plasmides de deuxième génération

Ce ne sont pas des plasmides naturels mais résultent de plusieurs transformations : plasmides "artificiels". La série la plus importante de ces plasmides est la série pBR 312 à pBR 322.

c) Plasmides de troisième génération

(ex: famille pUC) : dérivé de pBR322. Leur plus petite taille permet d'insérer un fragment d'ADN étranger plus grand.

3.2.2. Plasmide pBR322

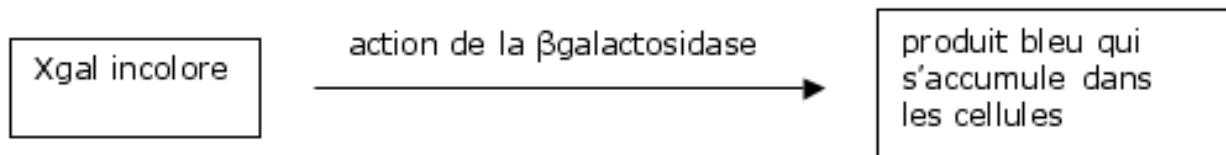
Le plasmide pBR322 est très simple dans sa structure. Il contient 2 gènes de résistance aux antibiotiques, tetR (tétracycline) et ampR (ampicilline). Chacun de ces gènes contient un site de restriction qui est utilisé pour le clonage. L'ADN du donneur peut être, par exemple, inséré dans le gène tetR. Une insertion réussie se traduira par l'inactivation de ce gène qui ne sera plus capable de conférer la résistance à la tétracycline à la cellule hôte (Fig. 4).

3.2.3. Plasmide pUC

Un plasmide pUC (*Plasmide of University of California*) est un plasmide pBR dans lequel on a remplacé le gène de résistance à la tétracycline (qui sert à repérer les plasmides recombinés) par un gène bactérien **lac Z** (qui code pour la β galactosidase, une enzyme capable d'hydrolyser les β -galactosides (comme le galactose) en monosaccharides (glucose par exemple)) (Fig. 5).

Un produit non toxique pour la cellule bactérienne est également substrat de la galactosidase : le Xgal (ou le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (C₁₄H₁₅BrClNO₆) (Fig. 6).

Les plasmides de la famille pUC sont des vecteurs plus élaborés dont la structure permet la sélection visuelle directe des colonies contenant l'ADN inséré.



Donc un plasmide pUC natif apportera le gène lacZ fonctionnel et une bactérie qui le portera, cultivée sur milieu additionné de Xgal deviendra bleue, alors qu'un pUC recombiné aura perdu l'intégralité de son gène lac Z et la bactérie qui le portera donnera un clone qui restera blanc.

3.2.4. Etapes de clonage par les plasmides

1) Isolement du fragment d'ADN

Il faut tout d'abord posséder le fragment d'ADN que l'on veut cloner. En général, ce fragment est un morceau d'ADN provenant du génome d'une cellule eucaryote ou procaryote et qui a été isolé après digestion par une enzyme de restriction.

2) Insertion de l'ADN dans le plasmide (ligature)

Le plasmide doit tout d'abord linéarisé par digestion avec la même enzyme de restriction que celle a été utilisée pour préparer le fragment d'ADN. N'oublions pas que le site utilisé doit être unique dans le *polylinker* de façon à ne couper le plasmide qu'une fois. L'ADN « étranger » est mélangé avec le plasmide dans des conditions particulières et en présence de ligase. Pendant l'incubation, les bouts cohésifs des sites de restriction vont s'associer par des liaisons hydrogènes. La ligase va ensuite créer les liaisons phosphodiester entre les extrémités 5' P et 3' OH et dans ce cas le plasmide est dit **recombinant**. Notons que tous les plasmides ne vont pas incorporer l'ADN étranger car certains pourront se refermer sur eux-mêmes (**plasmides non recombinants**) (fig.7 et 8).

3) Transformation

Les molécules d'ADN recombinantes ainsi préparées sont introduites dans des cellules (habituellement des bactéries (*Escherichia coli*) ou des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), parfois d'autres cellules eucaryotes) qui ont été rendues perméables à l'ADN de façon transitoire. Lorsque les cellules se divisent et se multiplient, les plasmides recombinants se répliquent également pour produire un très grand nombre de copies d'ADN renfermant l'ADN étranger.

4) Sélection et amplification

a) Sélection I (sélection des clones transformés)

Les bactéries transformées arrivent à cultiver sur un milieu contenant un antibiotique (ampicilline). Seules les bactéries qui ont incorporées le plasmide survivront car ils auront acquis la résistance à cet antibiotique par le vecteur plasmidique. C'est la première sélection. (Attention : il faut que la souche bactérienne soit sensible à cet antibiotique).

b) Sélection II (sélection des clones recombinants)

→**Si le plasmide utilisé est de type pBR322:** On utilise le gène de sélection dans lequel se situait le site de restriction de l'enzyme utilisée (tétracycline). Donc, les bactéries qui poussent sur le milieu contenant de l'ampicilline, sont répliquées sur un milieu additionné d'ampicilline et de tétracycline:

- Celles qui poussent ont reçu un plasmide natif.
- Celles qui ont reçu un plasmide recombinant sont tuées, elles sont récupérées sur la matrice (Fig. 9).

En effet, si le gène de résistance comprend un insert, il est altéré et donc il ne s'exprimera pas et les clones seront sensibles à cet antibiotique.

→ Si le plasmide utilisé est de la famille pUC: dans ce cas on utilise une méthode de coloration simple comme le système X-gal/IPTG permettant de distinguer par la couleur des colonies les plasmides qui ont insérés l'ADN étranger (colonies blanches) des plasmides sauvages (colonies bleues) (fig.10).

3.3. Les bactériophages

Un bactériophage (ou phage) est un virus n'infectant que des bactéries. En grec, **phageton** signifie nourriture/consommation. On les appelle également **virus bactériens** (voir la structure générale dans la Fig.9). Ce sont des outils fondamentaux de recherche et d'étude en génétique moléculaire. Les bactériophages servent entre autres, de vecteurs de clonage de gènes. Deux phages sont très utilisés comme vecteurs. Ce sont le phage λ (lambda) et le phage M 13 ou plus exactement des dérivés de ces deux phages qui doivent en effet subir divers types de modifications pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de clonage. Le bactériophage λ (lambda) (Enterobacteria phage λ) est un virus bactériophage qui infecte la bactérie *Escherichia coli* (Fig. 11).

3.3.1. La carte génétique

L'ADN double brin du bactériophage contient 48502 paires de nucléotides qui codent 50 à 60 protéines différentes. Le passage de la forme linéaire (dans la particule phagique libre) à la forme circulaire (dans l'ADN après injection dans la cellule hôte) est dû à la présence aux extrémités de la molécule linéaire de 12 nucléotides (**les extrémités cos**). Dans ce génome se trouve une région où l'on n'a jamais identifié ni mutants ni gènes, c'est la région non essentielle b2. Elle est immédiatement suivie par les gènes nécessaires pour la lysogénie mais pas pour le cycle lytique. L'ensemble fait à peu près 10 kbp (Fig. 12).

3.3.2. Les phages comme vecteur de clonage

La région b1 puisqu'elle n'est pas essentielle peut être remplacée par un fragment d'ADN d'une taille équivalente. On a alors **un vecteur de remplacement** de taille voisine de celle du génome naturel du bactériophage (Fig.13).

3.3.3. Etapes de clonage par un bactériophage

1. Préparation de l'ADN phagique : destruction des protéines de capsid et extraction de l'ADN.
2. digestion partielle de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction Sau3A et l'isolement de fragments de 15kpb.
3. élimination des parties non essentielles de virus et leurs remplacements par des inserts de 15 kpb.
4. ligature et formation des concatémères de phage lambda recombinant.
5. coupure et encapsidation in vitro ou « packaging » : par auto assemblage des virus. La collection des phages recombinants constitue ainsi une banque d'ADN.

Une banque construite à l'aide d'un bactériophage est constituée de particules phagiques (les fonctions de lysogénie ont été éliminées). Elle se présente donc comme un ensemble de **plages de lyse** sur un tapis bactérien (Fig.14).

4. Construction de banques

Les banques du mot anglais library sont des collections formées d'un très grand nombre de clones différents, parmi lesquels on recherchera le clone que l'on veut étudier. On distingue les banques génomiques et les banques d'ADNc.

4.1. Etablissement d'une banque génomique

Les différentes étapes principales sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN nucléaire.
- Digestion du génome avec des enzymes de restriction.
- Insertion des fragments d'ADN dans des vecteurs (plasmide ou phage ou YAC). Le vecteur doit être choisi en fonction de la taille des fragments d'ADN à insérer.
- Ligature avec l'ADN ligase.
- Transformation (avec des plasmides) ou infection (avec phages) des bactéries.
- Culture des bactéries sur des milieux entiers.
- Toutes les bactéries qui portent une chimère se multiplieront et donneront des clones. (Fig. 15).

4.2. Les banques d'ADNc

L'ADNc est un ADN complémentaire obtenu à partir d'ARNm suite à l'action d'une transcriptase réverse d'origine viral. Dans ce cas les banques obtenus sont spécifiques du type cellulaire d'où ont été isolés les ARNm : une banque du pancréas contient des ADNc de l'insuline mais pas les ADNc de la myéline qu'en retrouve dans une banque d'ADNc de cerveau par exemple (Fig. 16).

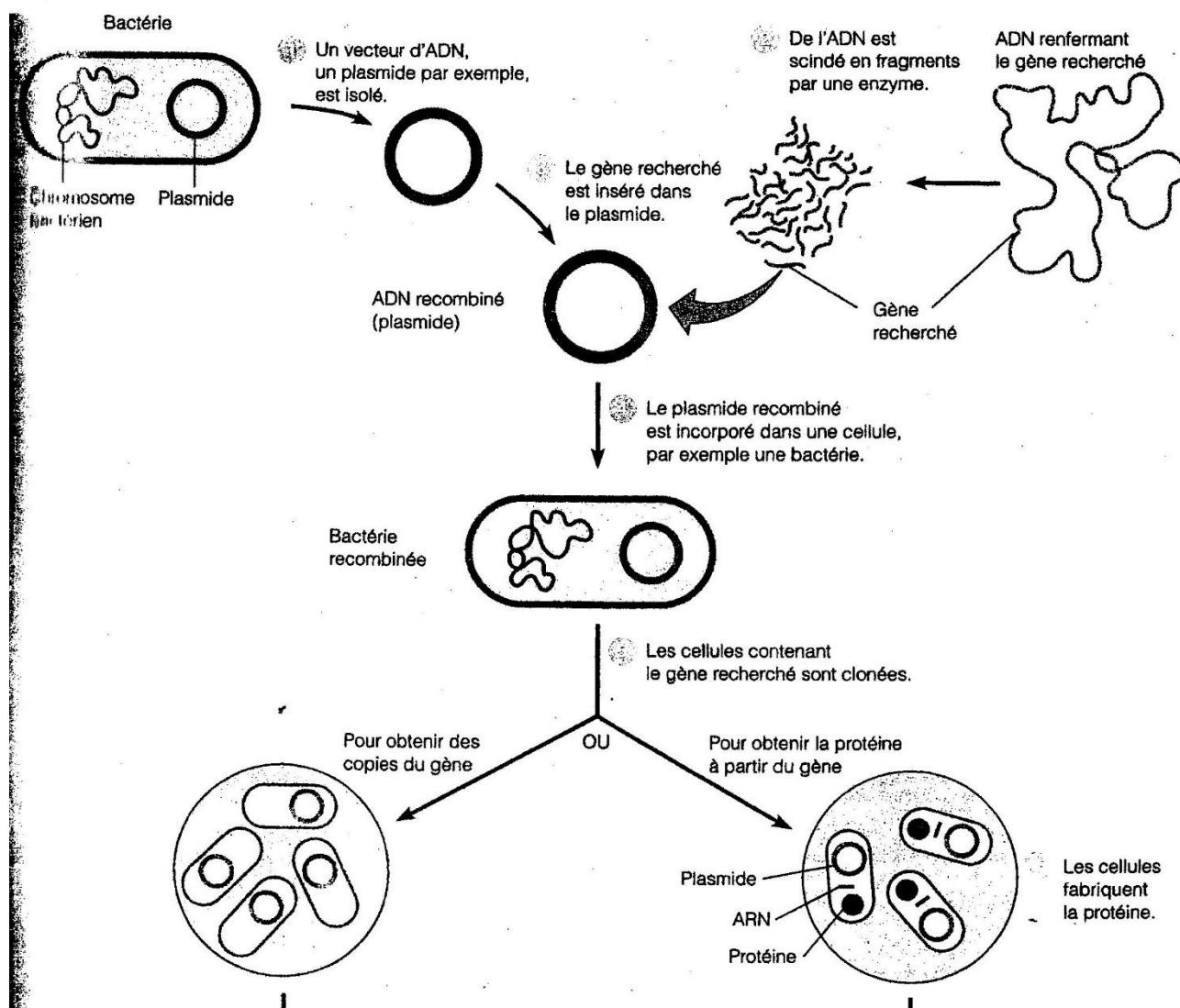


Fig.1. Principe du clonage moléculaire.

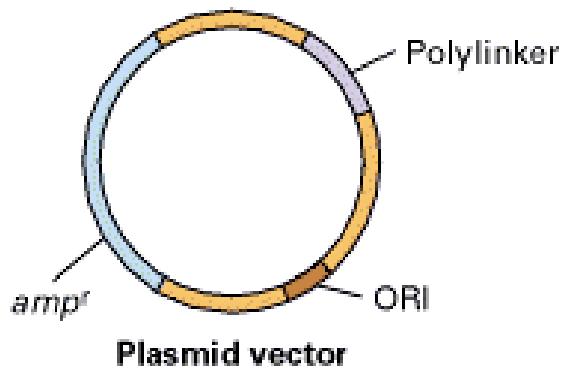


Fig.2. Structure générale d'un vecteur de clonage.

(a) Sequence of polylinker

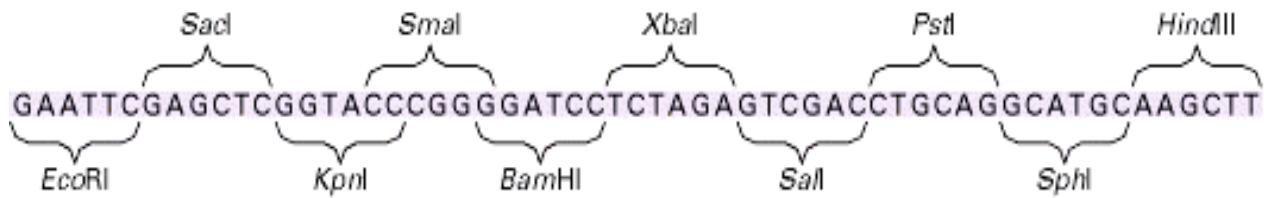


Fig. 3. Structure d'un polylinker.

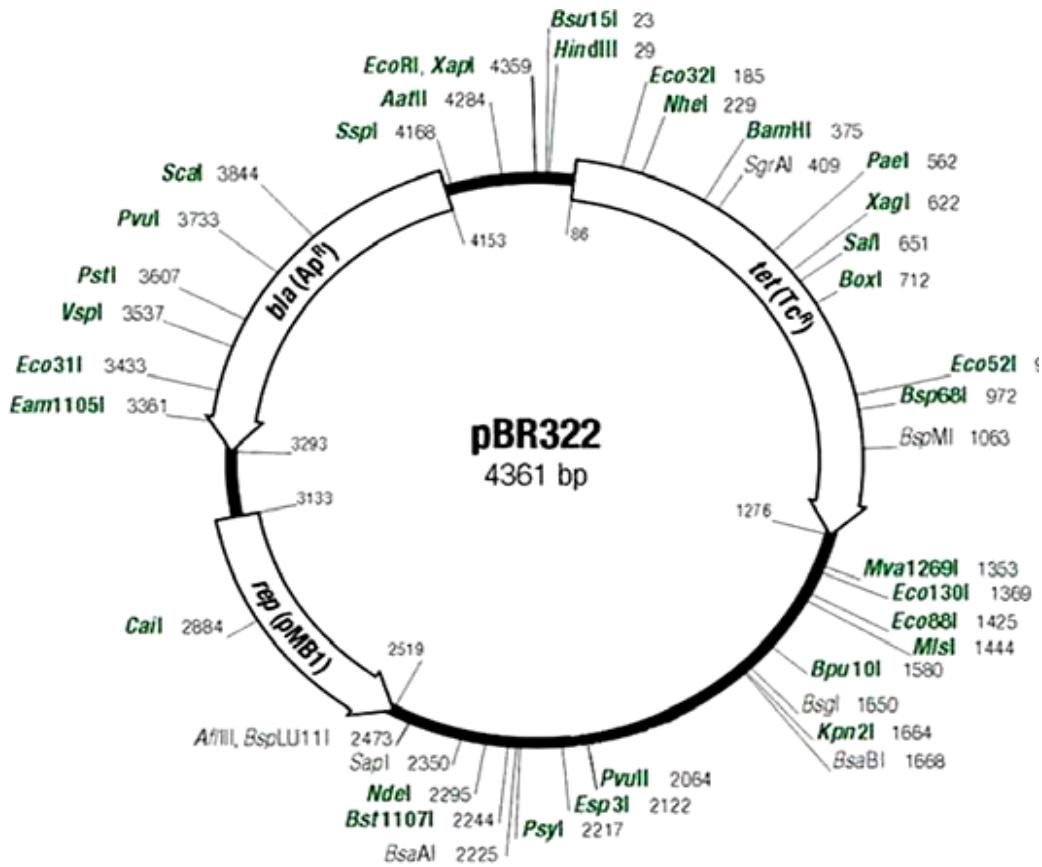


Fig. 4. Carte du plasmide pBR322.

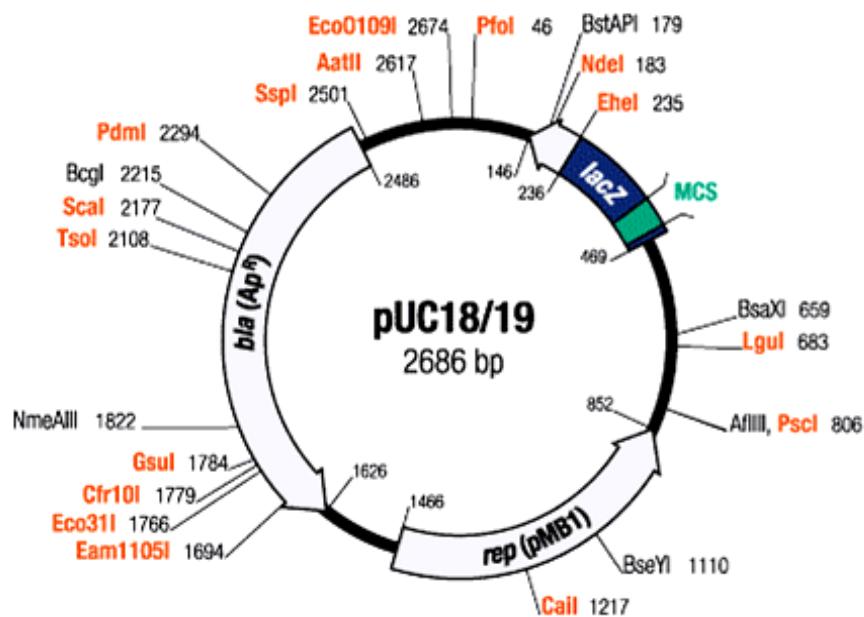


Fig. 5. Carte du plasmide Puc18/19.

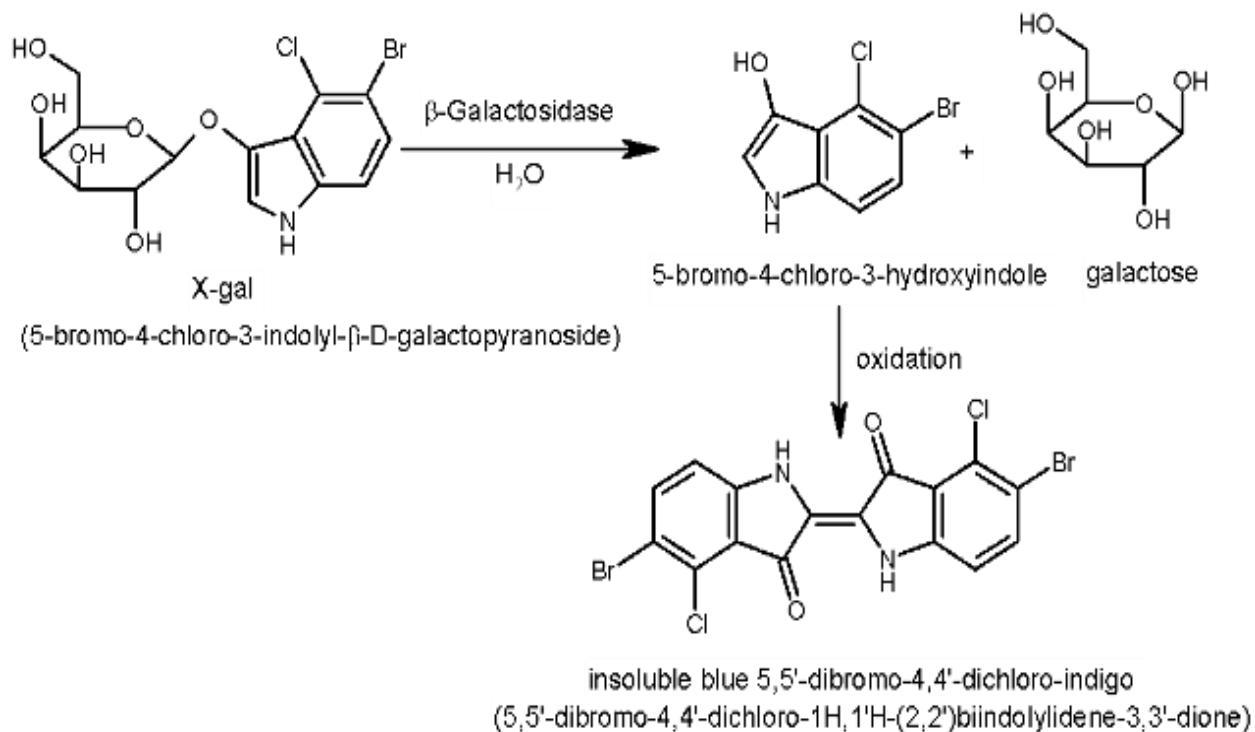


Fig. 6. X-gal

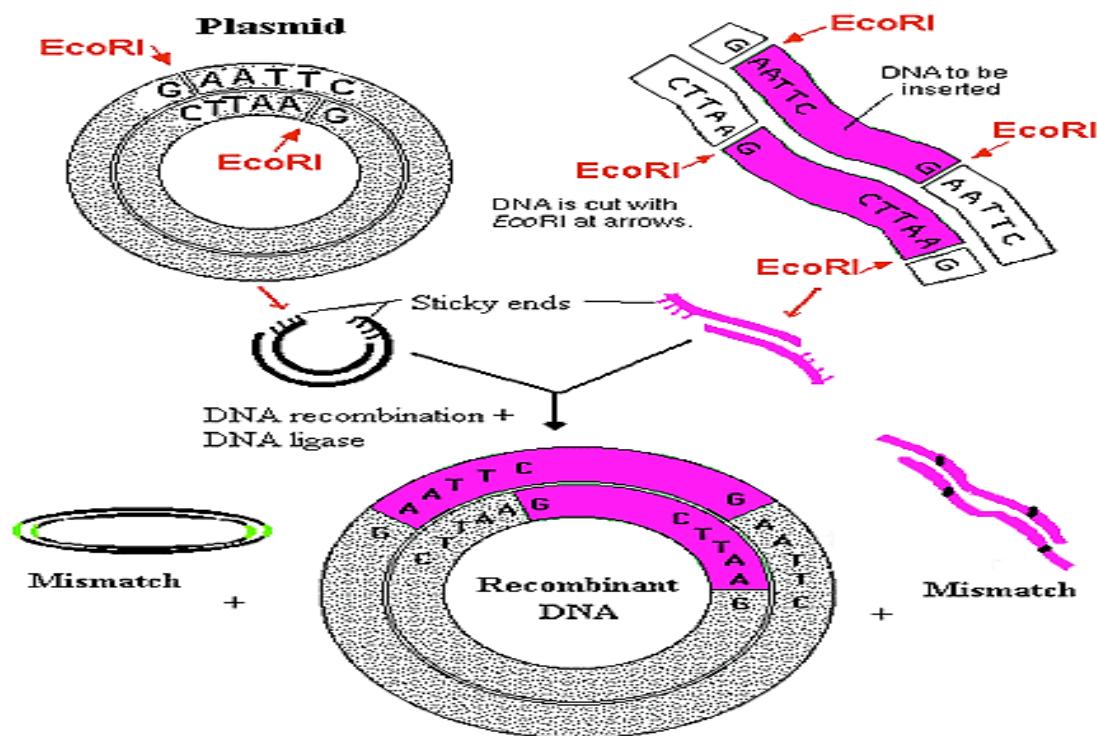
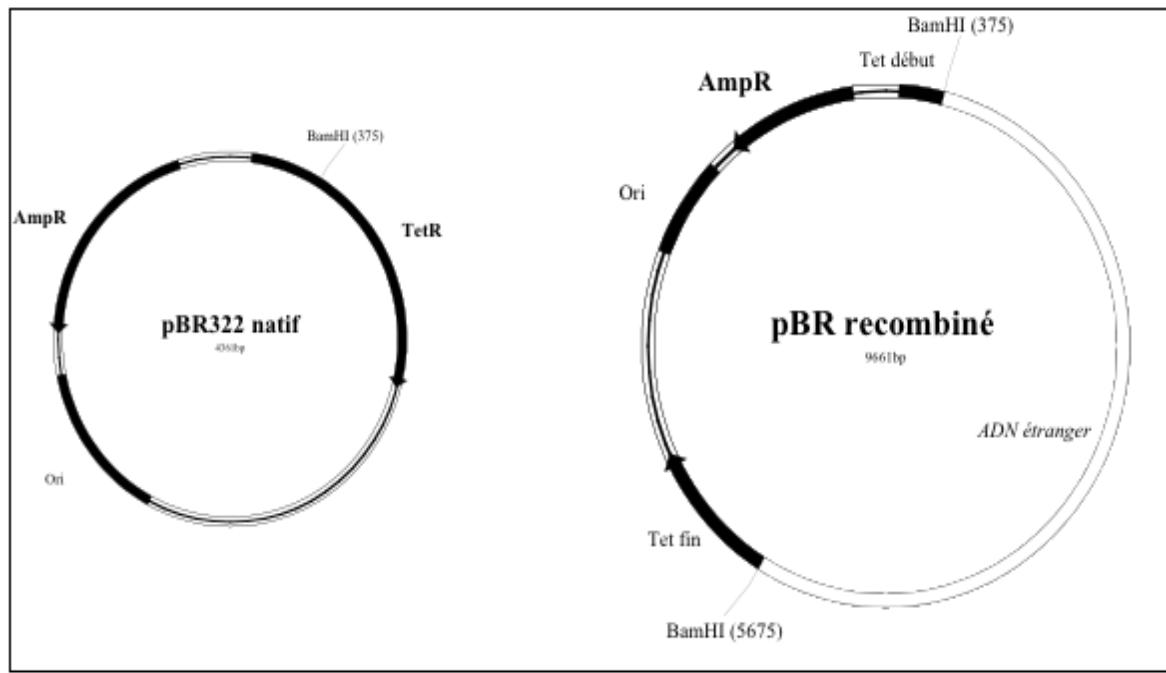


Fig. 7. Insertion d'ADN étranger dans un plasmide.



Vecteur non recombinant

Vecteur recombinant

Fig. 8. Vecteur recombinant et non recombinant.

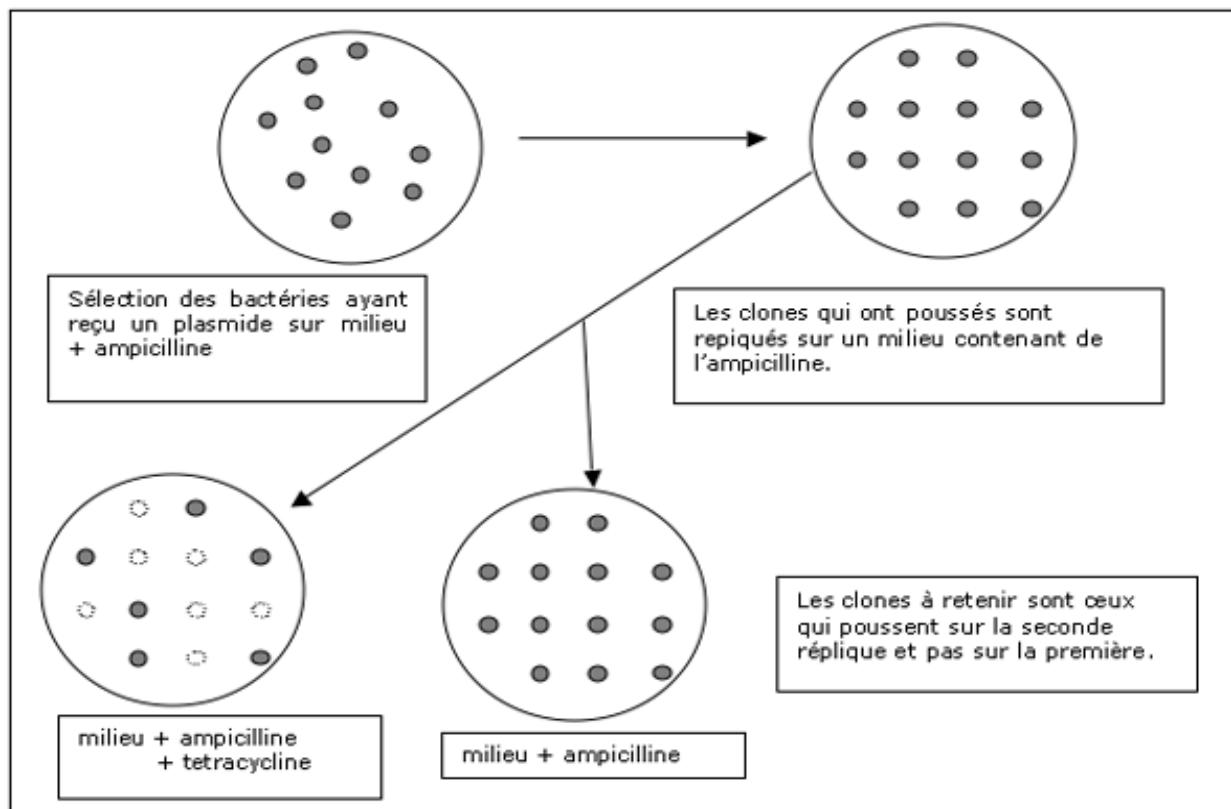


Fig. 9. Sélection des bactéries transformées et repérage des bactéries portant un plasmide pBR322 recombinant.

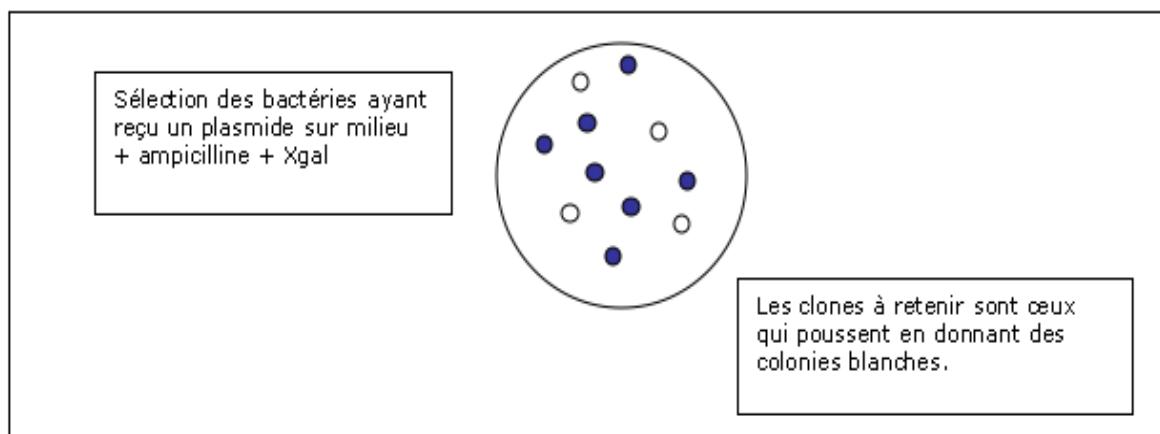


Fig. 10. Sélection des bactéries transformées portant un plasmide pUC recombinant.

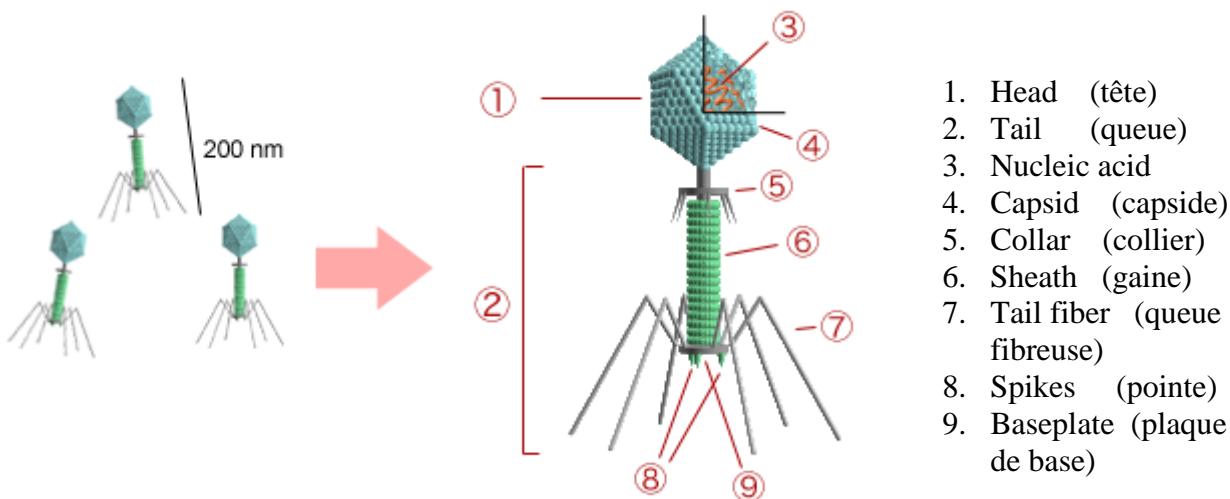


Fig.11. Structure d'un bactériophage.

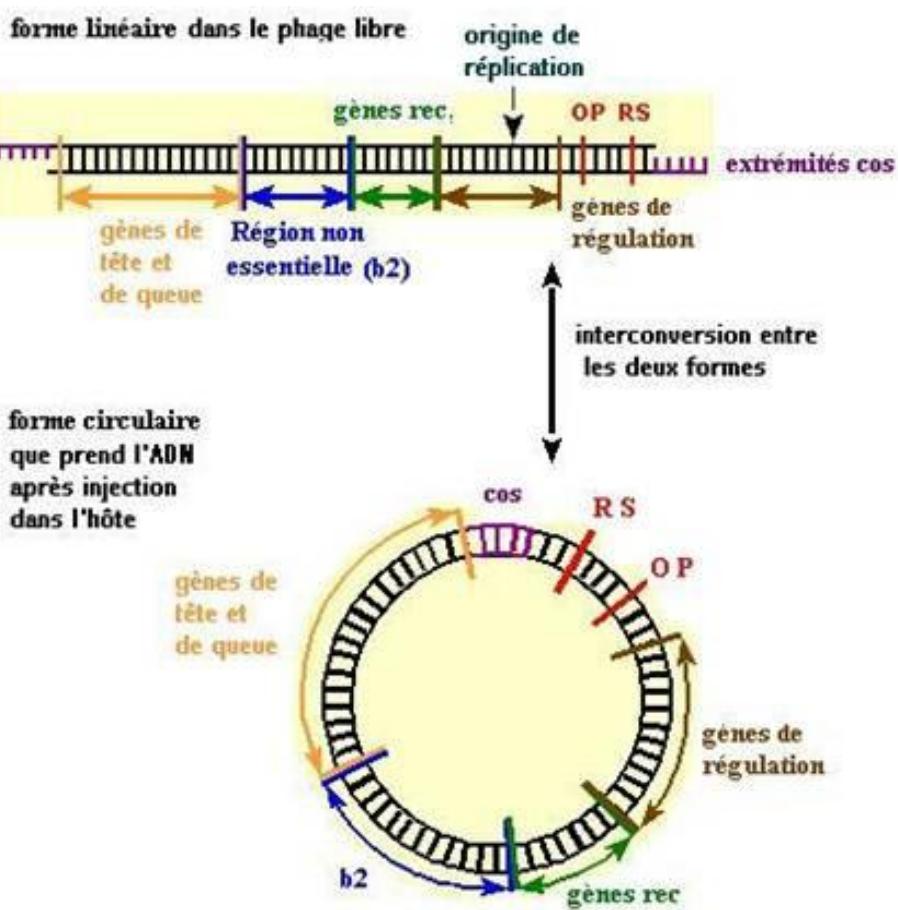


Fig. 12. Carte génétique du bactériophage λ

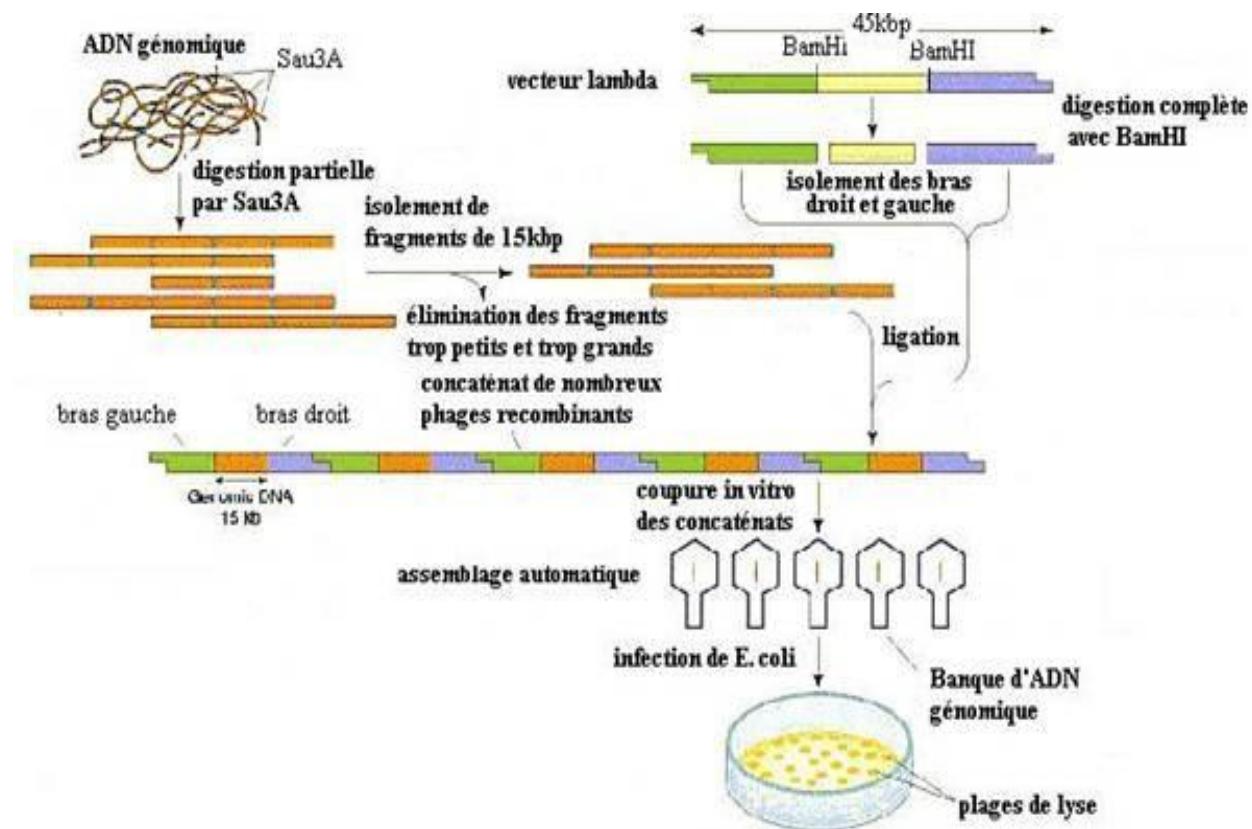


Fig.13. Etapes de clonage par un bactériophage.

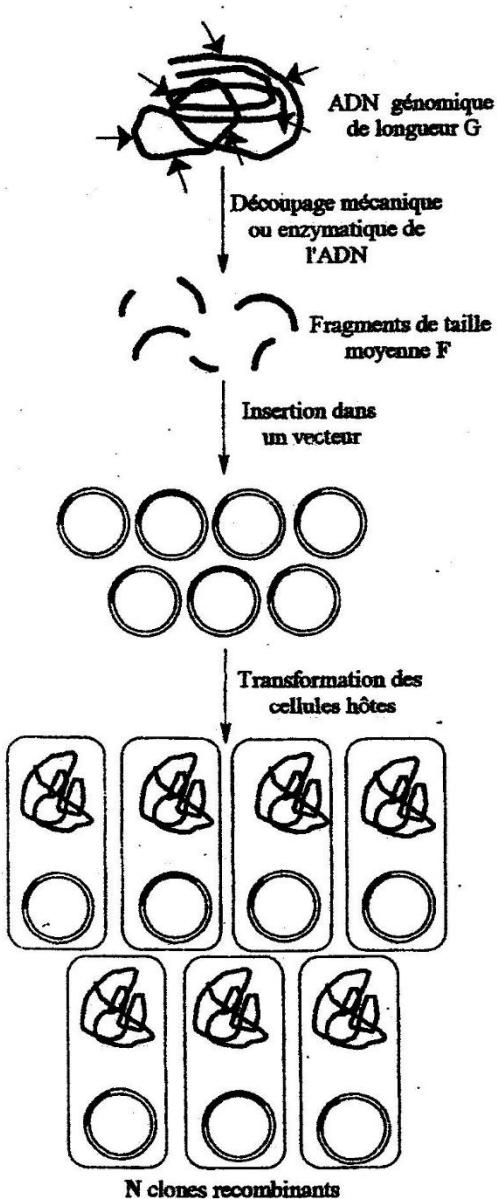


Fig.14. Banque d'ADN génomique.

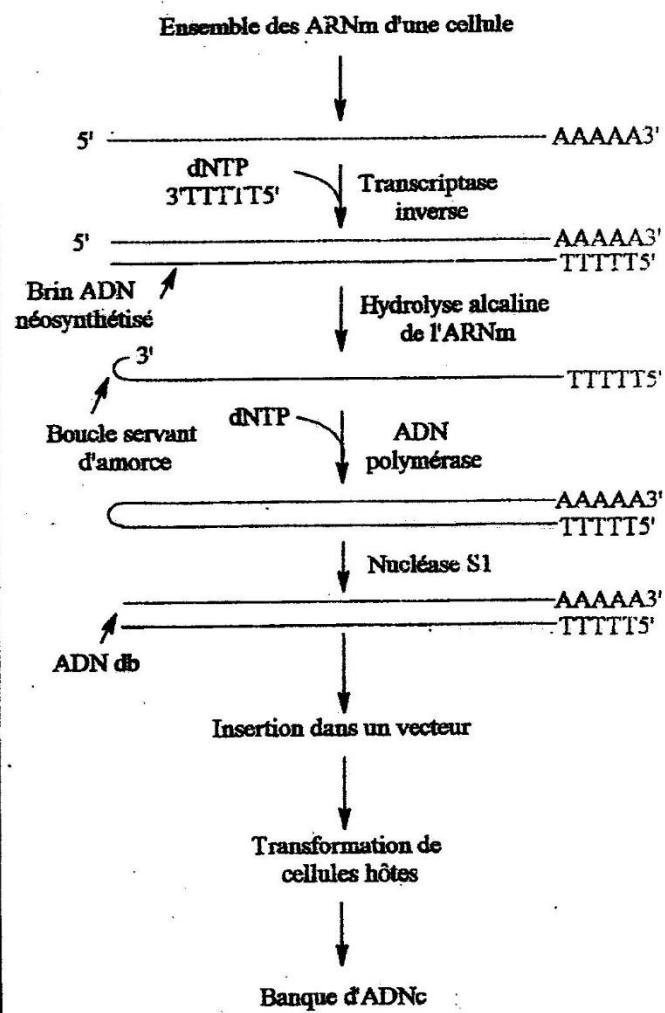


Fig.15. Banque d'ADNc.