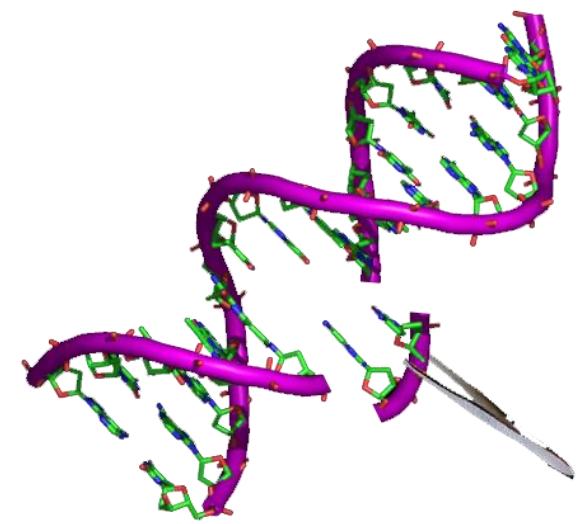


Génie Génétique

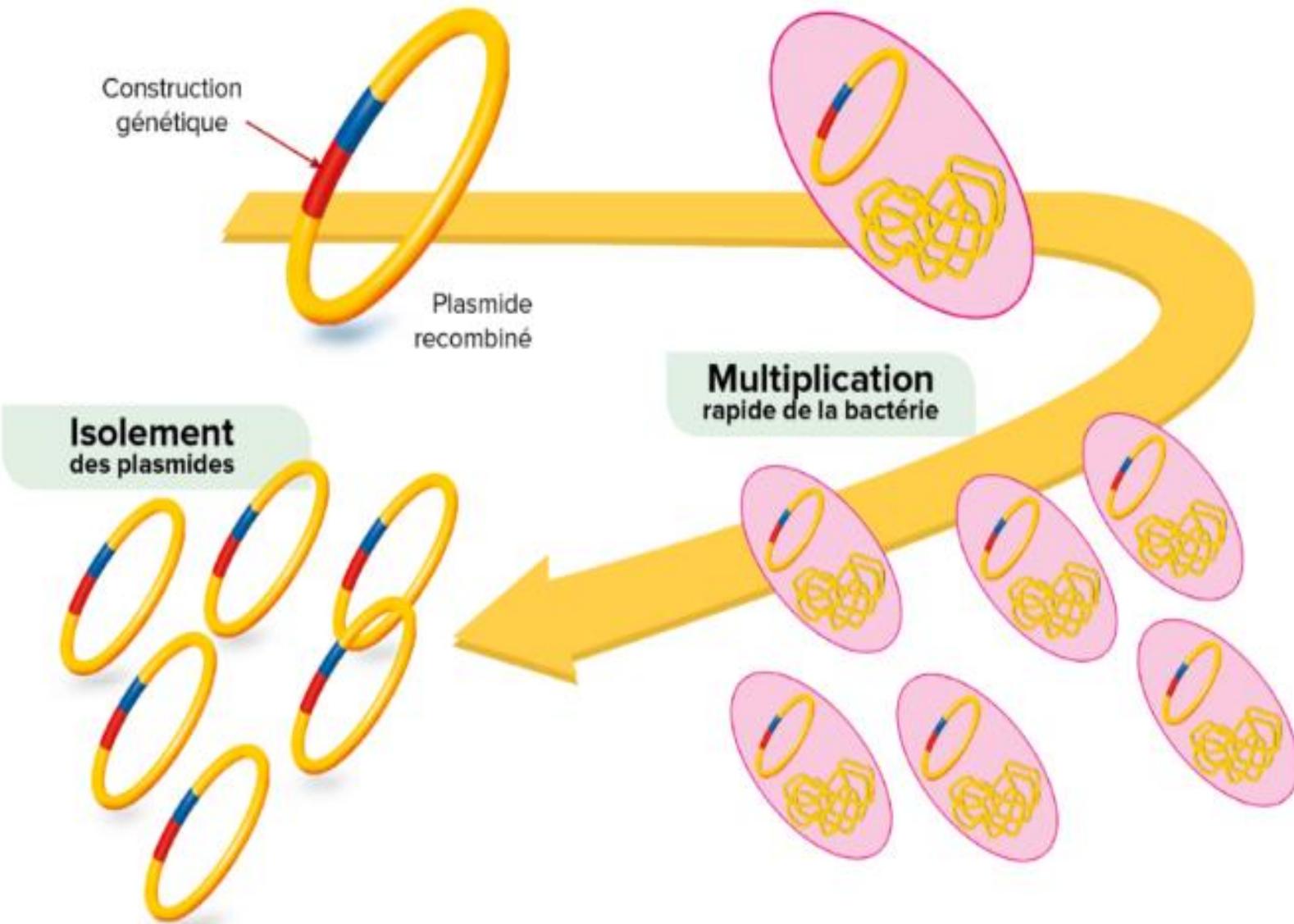
Licence Biologie Moléculaire

Dr. Bouridane Hamida

2019/2020



Chapitre 03: Le clonage



Le clonage :

Un clone correspond à un grand nombre de molécules ou de cellules identiques provenant d'un seul ancêtre (cellule ou molécule). L'opération qui consiste à obtenir ce grand nombre de cellules ou de molécules s'appelle *le clonage*.

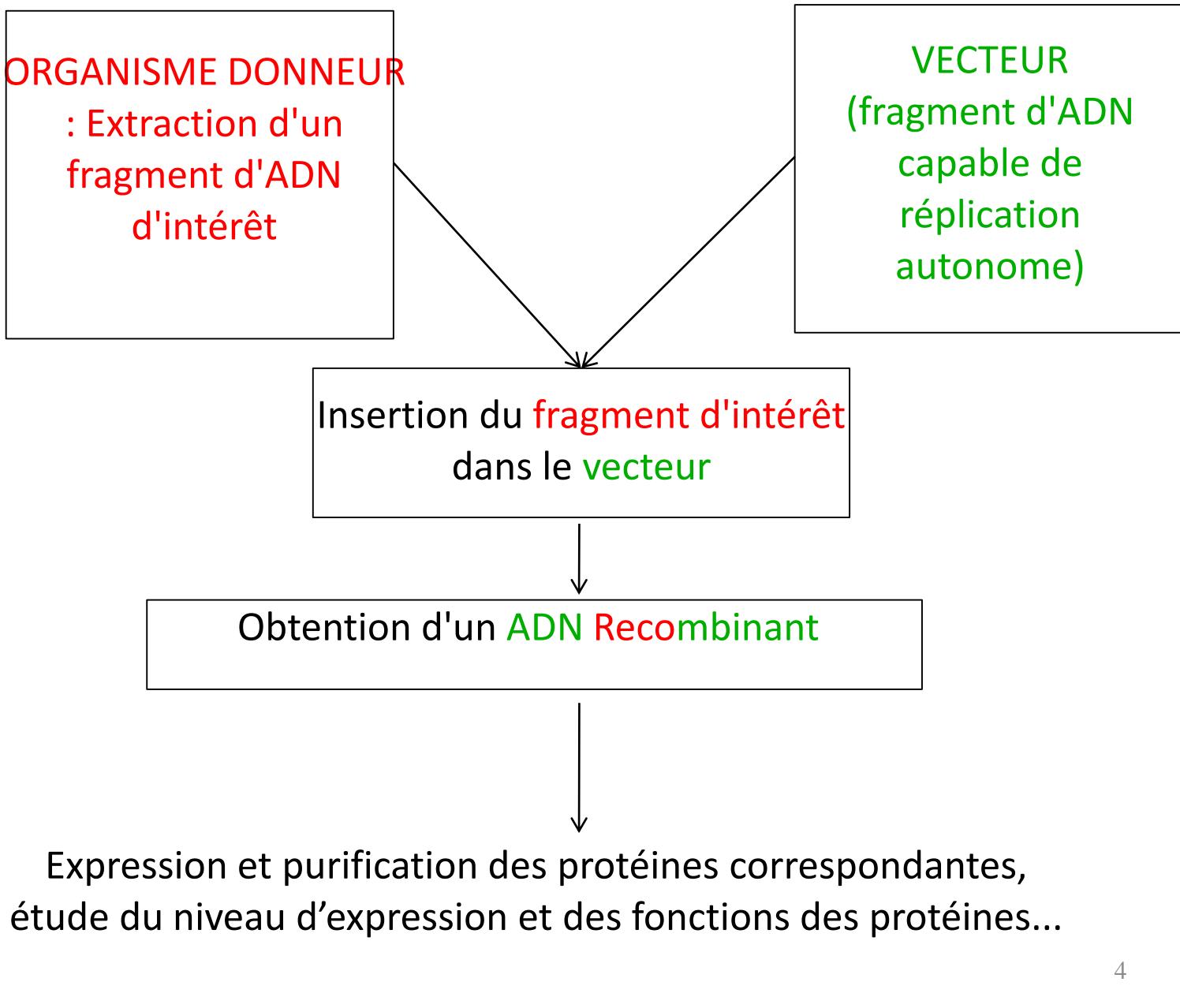
Le clonage nucléique consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur, ce vecteur étant propagé dans une cellule hôte. La culture de cette cellule et la purification ultérieure du vecteur permettent de produire des quantités quasiment illimitées du fragment d'ADN cloné que l'on désire étudier.

Principe: Le clonage consiste a:

- 1) insérer un fragment d'ADN étranger a cloner (insert) dans un vecteur de manière a 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.

Principe de la technologie de l'ADN recombinant

II) Utilisation de l'ADN recombinant
I) Obtention de l'ADN recombinant



Les bases du clonage de l'ADN

I) Obtention de l'ADN recombinant

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur

2) Amplification du fragment d'ADN du donneur

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur :
- Digestion
- Ligation

3) Présentation d'un vecteur

VECTEUR
(fragment d'ADN capable de réplication autonome)

Insertion du **fragment d'intérêt** dans le **vecteur**

5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu

6) Vérification de la construction

I) Obtention de l'ADN recombinant

ORGANISME DONNEUR
: Extraction d'un
fragment d'ADN
d'intérêt

- 1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur
- 2) Amplification du fragment d'ADN d'intérêt

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur

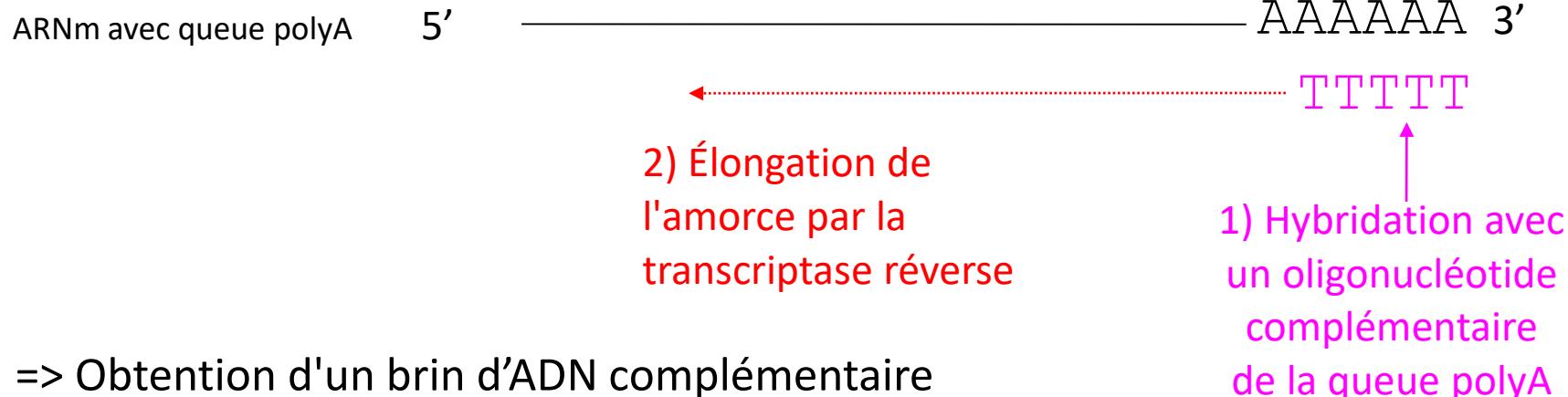
L'ADN de l'organisme donneur peut être :

- de l'**ADN génomique** (extrait à partir d'une culture cellulaire...)

- de l'**ADN complémentaire** (ADNc) obtenu par **transcription réverse** sur des ARN messagers

(L'ADNc comporte une information sur les régions 5' et 3' non traduites, et ne contient pas d'introns)

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur



Pour obtenir le deuxième brin d'ADNc, une PCR est réalisée sur l'ADN obtenu avec une ADN polymérase. L'ARN peut être éliminé par un traitement la RNase.

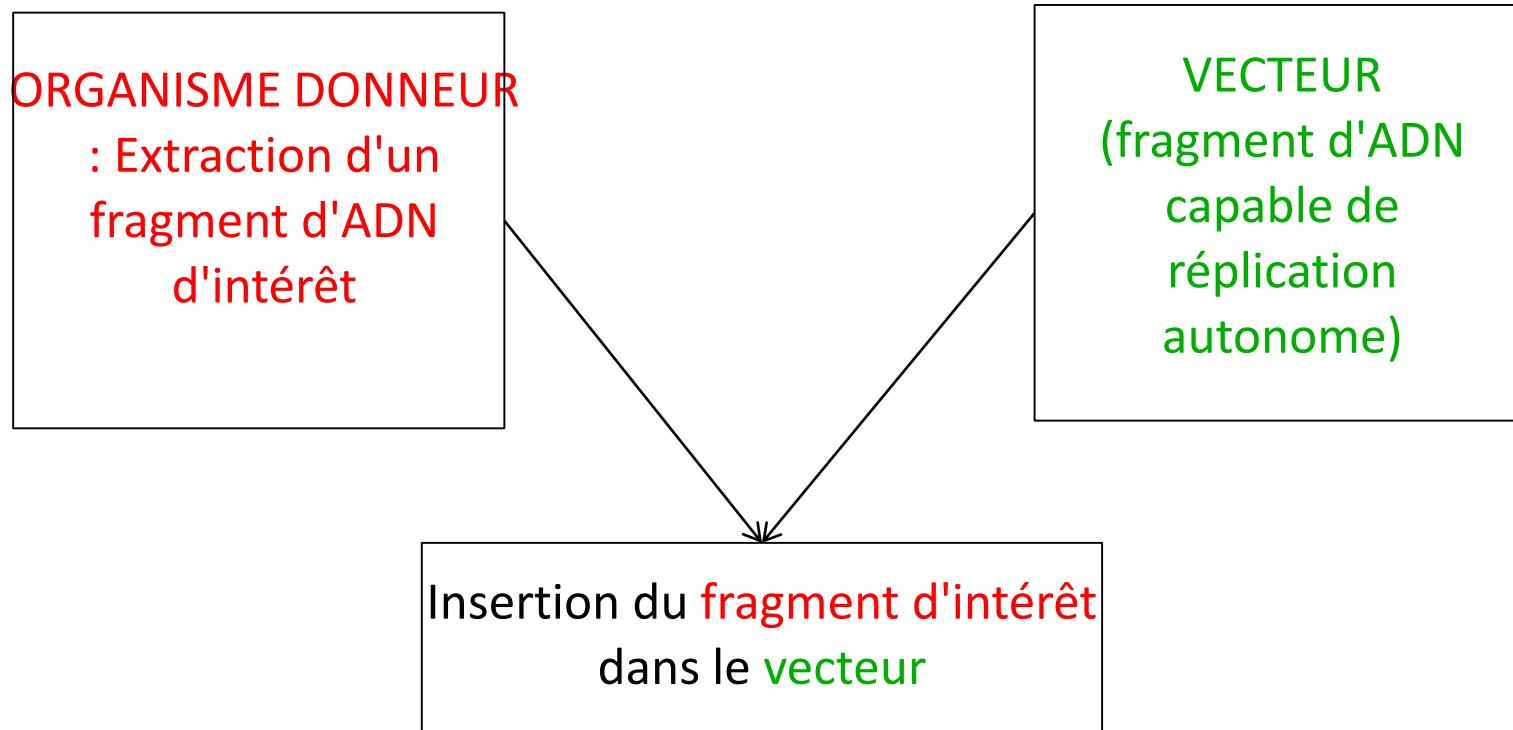
On peut obtenir une **banque d'ADNc** : clonage de tous les ADNc (cela dépend des ARNm exprimés par une cellule à un moment donné dans des conditions données)

On peut aussi cloner un ADNc spécifique en choisissant une **amorce à cheval sur la queue polyA et le 3' du transcript**

2) Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

- Amplification du fragment d'ADN d'intérêt (gène entier ou tronqué) par **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*
- La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne à partir d'amorces spécifiques de l'ADN d'intérêt, grâce à l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase dans un milieu contenant des nucléotides

I) Obtention de l'ADN recombinant



4) Insertion de l'ADN dans le vecteur :

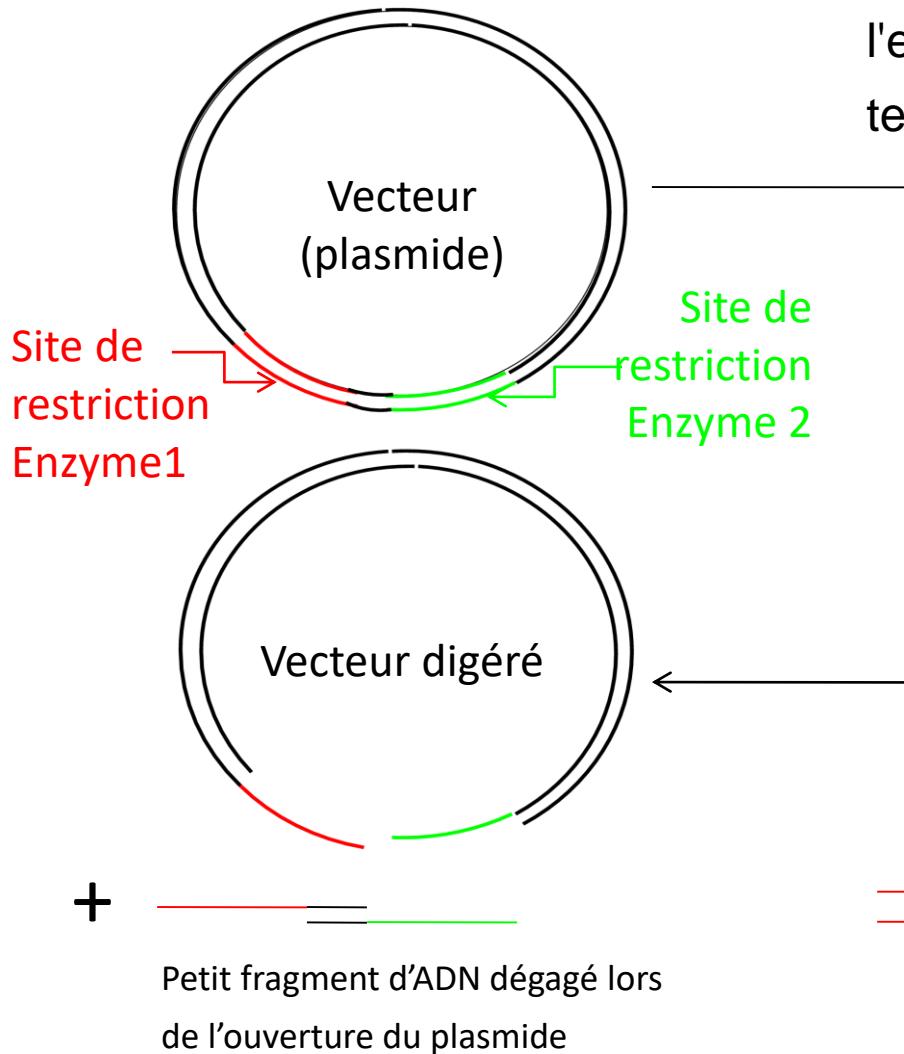
4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues, dont un grand nombre se retrouve naturellement chez la bactérie. En effet, les enzymes de restriction peuvent couper (et ainsi conduire à la destruction) de l'ADN étranger (notamment des virus). Cela limite les infections virales chez les bactéries, d'où le terme de restriction. L'ADN bactérien lui-même est protégé de la coupure par des modifications du type méthylation.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

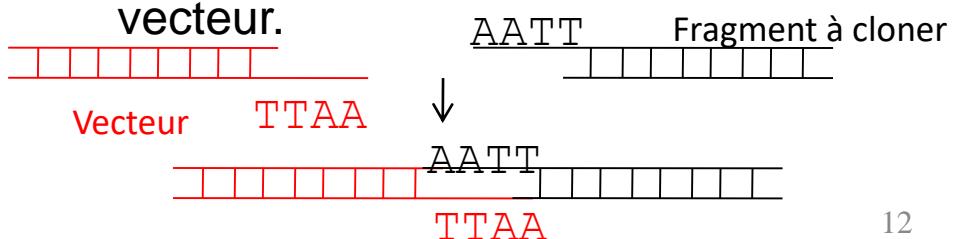
a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Principe



Digestion 1 heure dans le tampon adapté à l'enzyme (conditions bien précises...) à la température optimale de l'enzyme

Digestion par les enzymes 1 et 2
Création de 2 extrémités cohésives (ou franches) **1** et **2**.

Si l'on digère le fragment d'ADN par les deux mêmes enzymes 1 et 2, donnant des bouts collants, on obtient des extrémités cohésives complémentaires avec celles du vecteur. Ceci permet l'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur.

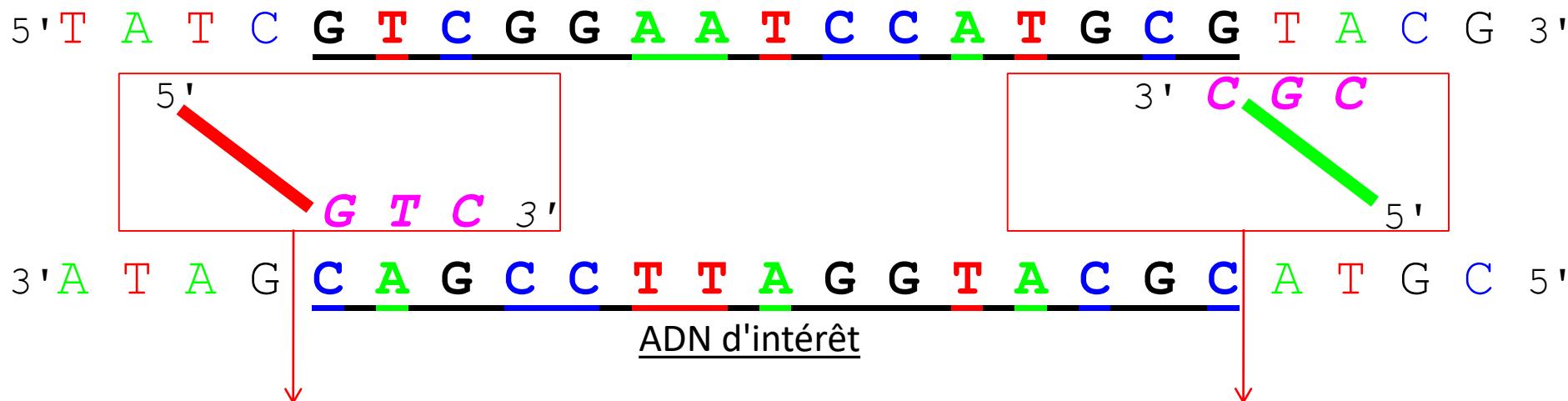


4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du fragment d'ADN

Le fragment d'ADN d'intérêt ne contient pas forcément les bons sites de restriction. Comment peut-on les ajouter aux extrémités de l'ADN à cloner ? Cela se fait par PCR avec des amorces spéciales :



Amorce avec une partie s'hybridant sur l'ADN à amplifier et une partie qui ne s'hybride pas comportant la séquence d'un site de restriction 1

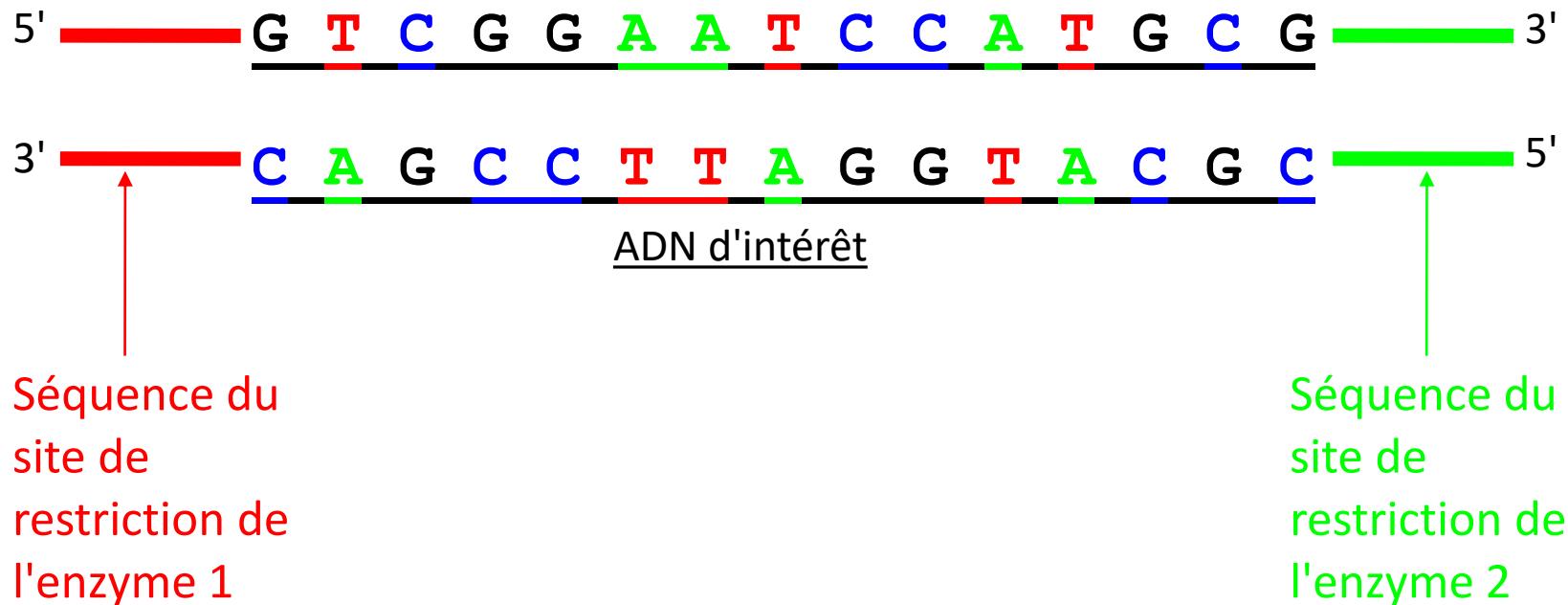
Amorce avec une partie s'hybridant sur l'ADN à amplifier et une partie qui ne s'hybride pas comportant la séquence d'un site de restriction 2

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du fragment d'ADN

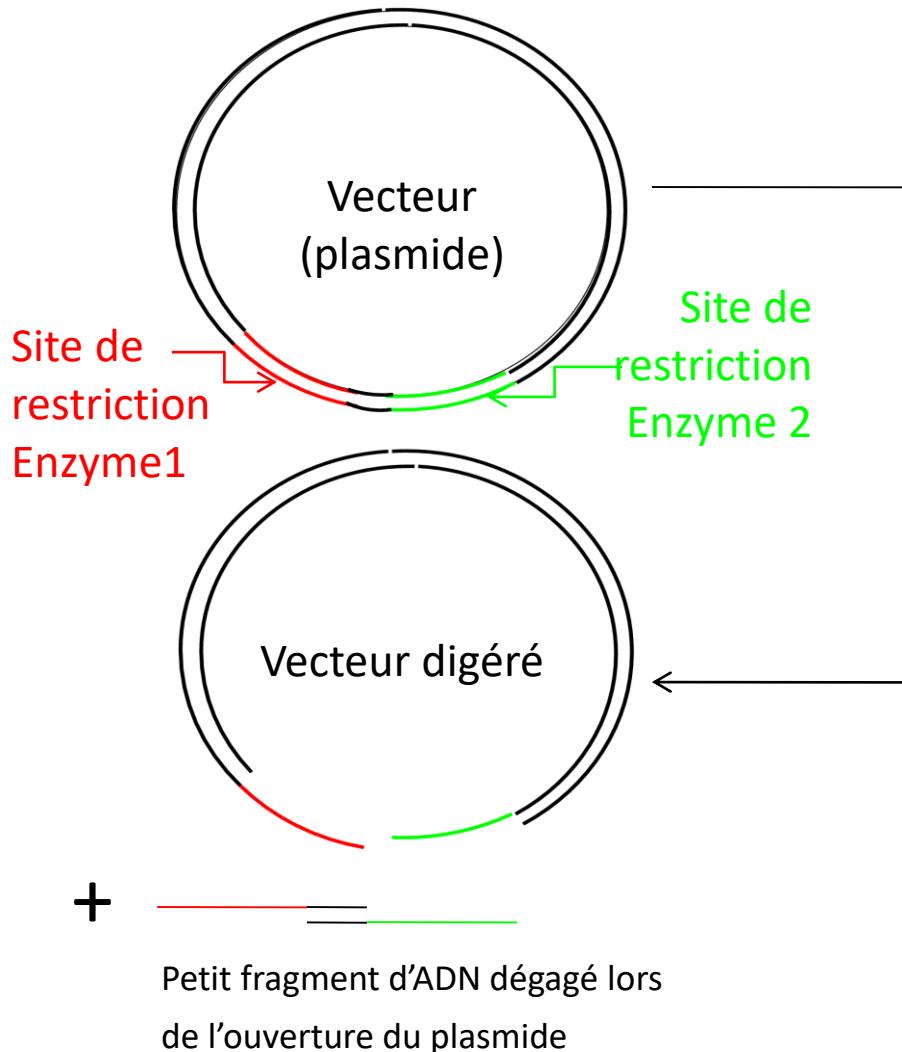
Voici l'ADN obtenu après PCR, avec les sites de restriction à ses extrémités. Il pourra être utilisé pour le clonage.



4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du vecteur



Digestion par les enzymes 1 et 2
Création de 2 extrémités cohésives (ou franches)
1 et 2.

Le fragment d'ADN doit être cloné dans le vecteur digéré. Le petit fragment dégagé peut se réinsérer dans le vecteur digéré à la place du fragment d'ADN à cloner. Il est donc nécessaire de séparer les deux produits de la digestion du vecteur et de purifier le vecteur digéré pour la suite du clonage.

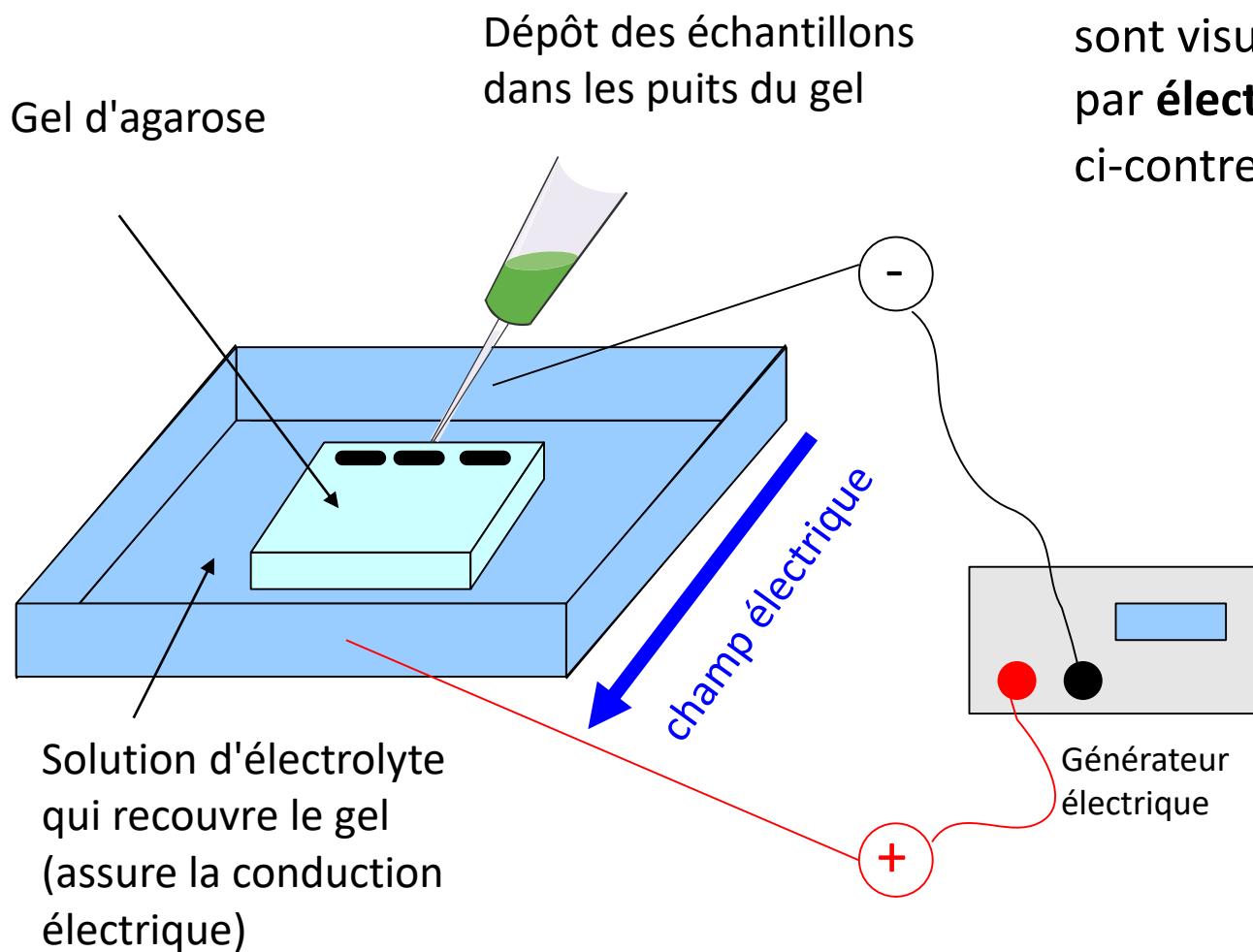
4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré

- L'**électrophorèse** est une méthode de séparation des particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle s'applique aux : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques, nucléotides
- La migration dépend de la charge et de la géométrie des particules
- L'électrophorèse peut se faire en veine liquide ou sur un support homogène, poreux et relativement inerte (papier, gels...)

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose



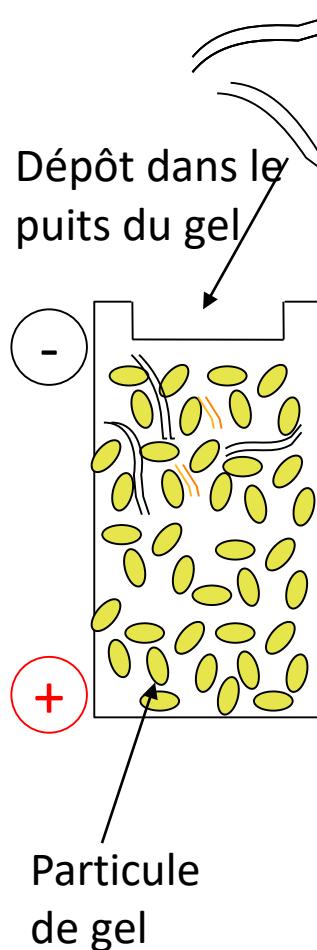
Les fragments de restriction sont visualisés sur gel d'agarose par **électrophorèse** : ci-contre le dispositif utilisé

Principe : migration des fragments d'ADN dans un champ électrique, séparation en fonction de leur taille

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

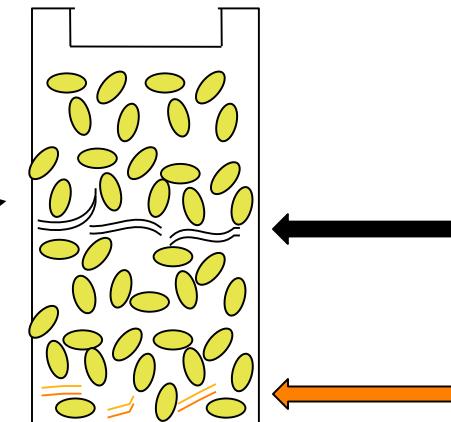
a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose

Principe de l'électrophorèse :



Fragments de restriction :
vecteur digéré et bout
dégagé par la restriction

Migration des fragments
d'ADN entre les particules
de gel selon le gradient
électrique
(les acides nucléiques sont
globalement négatifs,
déplacement vers le pôle +)

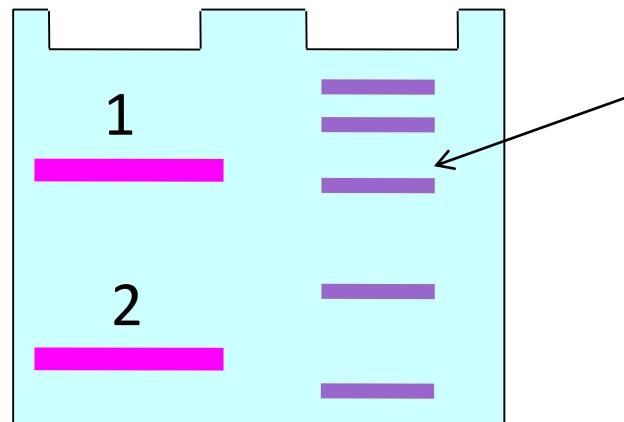


Les fragments d'ADN
migrent de façon
inversement
proportionnelle à leur
taille : les plus gros
fragments migrent
lentement tandis que les
petits fragments migrent
plus vite

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose

Révélation du gel par incubation avec un intercalant d'ADN (fluorescent)



1 : bande du vecteur digéré

2 : petit fragment extrait du vecteur lors de la digestion

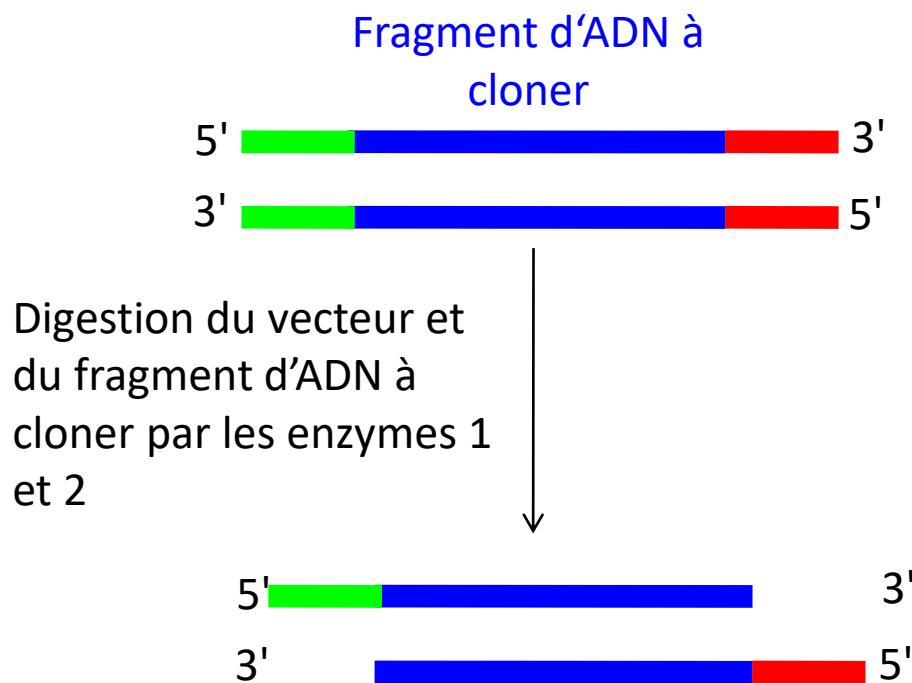
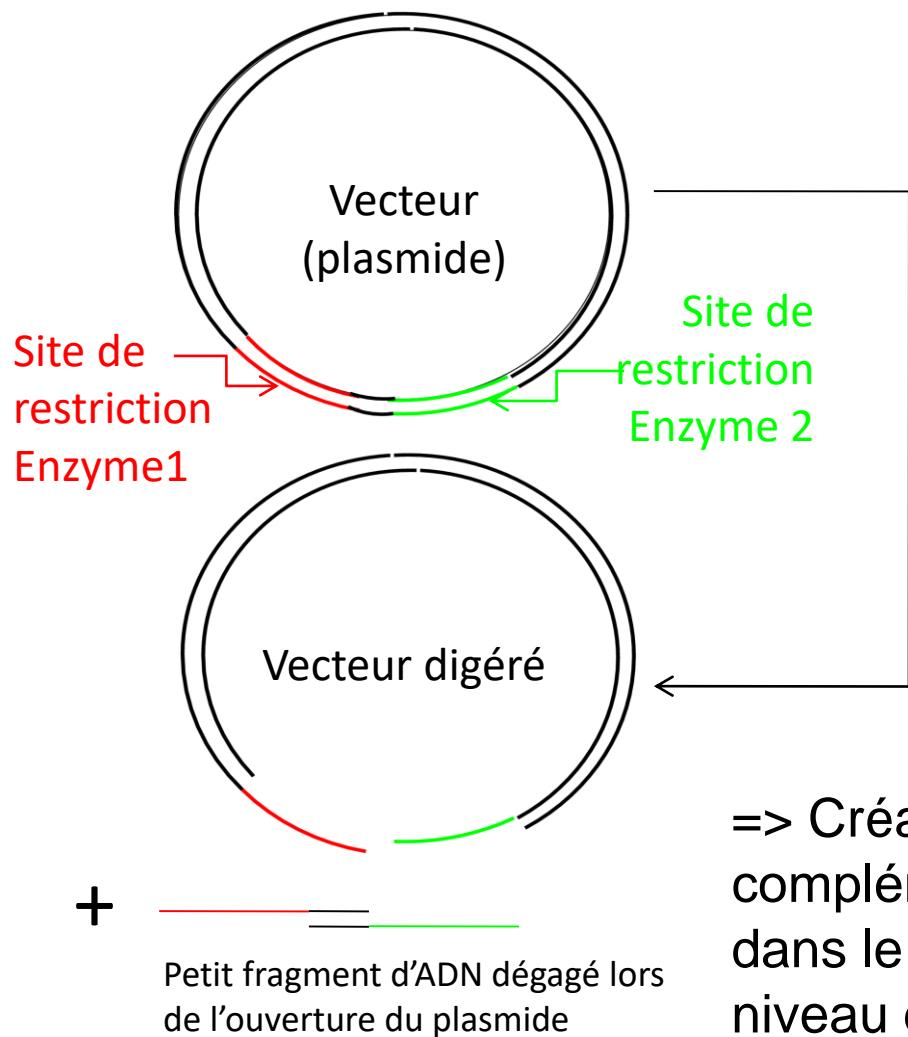
Marqueur de poids moléculaire : fragments de taille connue (obtenus par exemple après digestion enzymatique de l'ADN du bactériophage Lambda) => cela permet de déterminer la taille des bandes d'intérêt par comparaison au marqueur

Il est possible de récupérer la bande 1 : on découpe la bande sur le gel, on extrait l'ADN de l'agarose et on le purifie sur une colonne (fixation de l'ADN sur la colonne, lavage, puis élution de l'ADN purifié) => on récupère ainsi l'ADN du vecteur digéré, utilisé pour le clonage.

Cette purification sur gel permet aussi d'éliminer en partie les traces de vecteur non digéré. Si le fragment d'ADN dégagé à éliminer est très petit, une purification sur colonne peut être suffisante.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

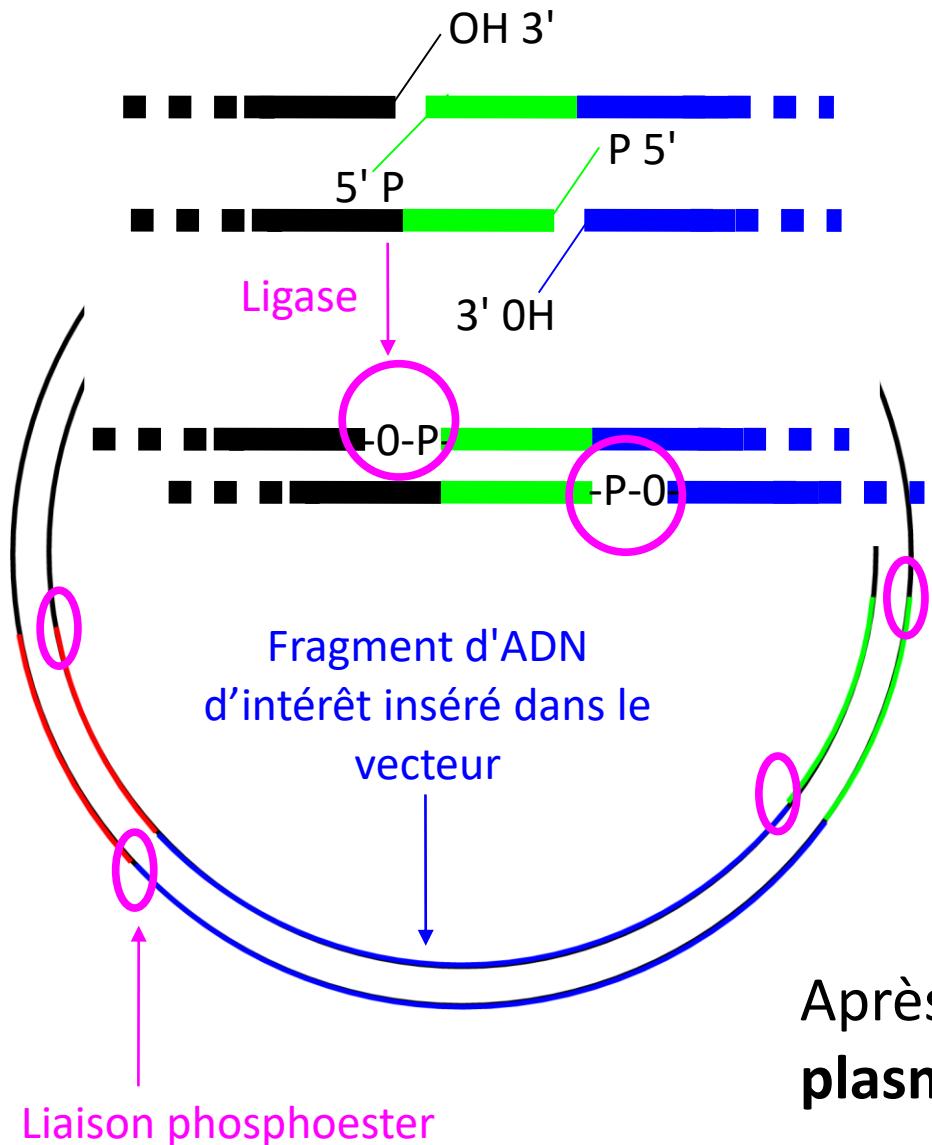
b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



=> Création d'extrémités collantes complémentaires. Insertion du fragment d'ADN dans le **vecteur ouvert purifié**, hybridation au niveau des extrémités complémentaires. Il reste à lier ces deux morceaux d'ADN de façon covalente.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



- La **ligase** est une enzyme capable de former des **liaisons covalentes** (formation de liaisons *phosphoester*) entre deux molécules d'ADN (au niveau d'une zone d'hybridation des molécules d'ADN)
- Intérêt d'utiliser deux enzymes différentes lors de la digestion :
 - insertion orientée de l'ADN à cloner dans le vecteur
 - limitation de la religation du vecteur sur lui-même

Après ligation, on obtient un **plasmide recombiné**

Banques d'ADN

Clonage en aveugle et clonage dirigé.

Une banque représente une collection aléatoire de fragments, non préalablement identifiés : on parle de clonage en aveugle (ou *shotgun cloning* en anglais). Par opposition on réalisera un clonage dirigé si on purifie un fragment de restriction particulier (à partir d'un cosmide par exemple) pour le cloner dans un vecteur (un plasmide par exemple).

Les banques de clones

La construction d'une banque de clones est une étape préalable nécessaire à la cartographie physique. L'étude d'un génome débute toujours par le découpage de l'ADN (digestion par des enzymes de restriction) en fragments qui sont insérés dans des constructions moléculaires appelées vecteurs de clonage. Ces derniers sont ensuite intégrés dans des cellules qui assureront le maintien et la réPLICATION du fragment d'ADN. Un ensemble de cellules portant des fragments d'ADN de l'espèce étudiée constitue une banque de clones (un fragment par clone).

-Banques d'ADN génomique

- Banques de cDNA

L'objectif de la banque est donc de conserver une collection de fragments d'ADN :

- bien identifiés,
- facilement manipulables,
- que l'on peut produire en grande quantité (en vue de leur étude).

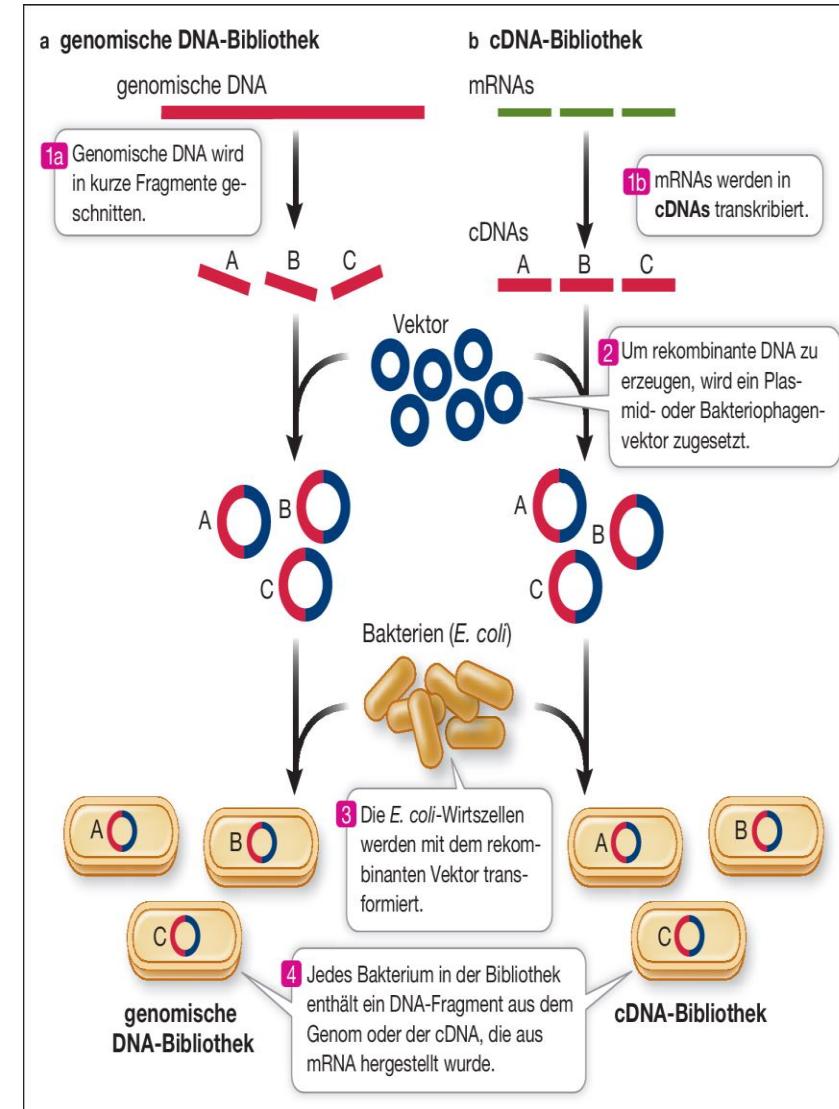
On pourra notamment alors procéder au séquençage de chacun de ces fragments.

Les banques

On distingue des banques d'ADNc et des banques d'ADN génomique. La banque d'ADNc représente la population des ARNm d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme à un moment donné.

La seconde, la banque génomique, doit représenter l'ensemble de l'ADN génomique d'un individu.

Une banque est donc la conversion d'une population d'ARN ou d'un génome en clones.

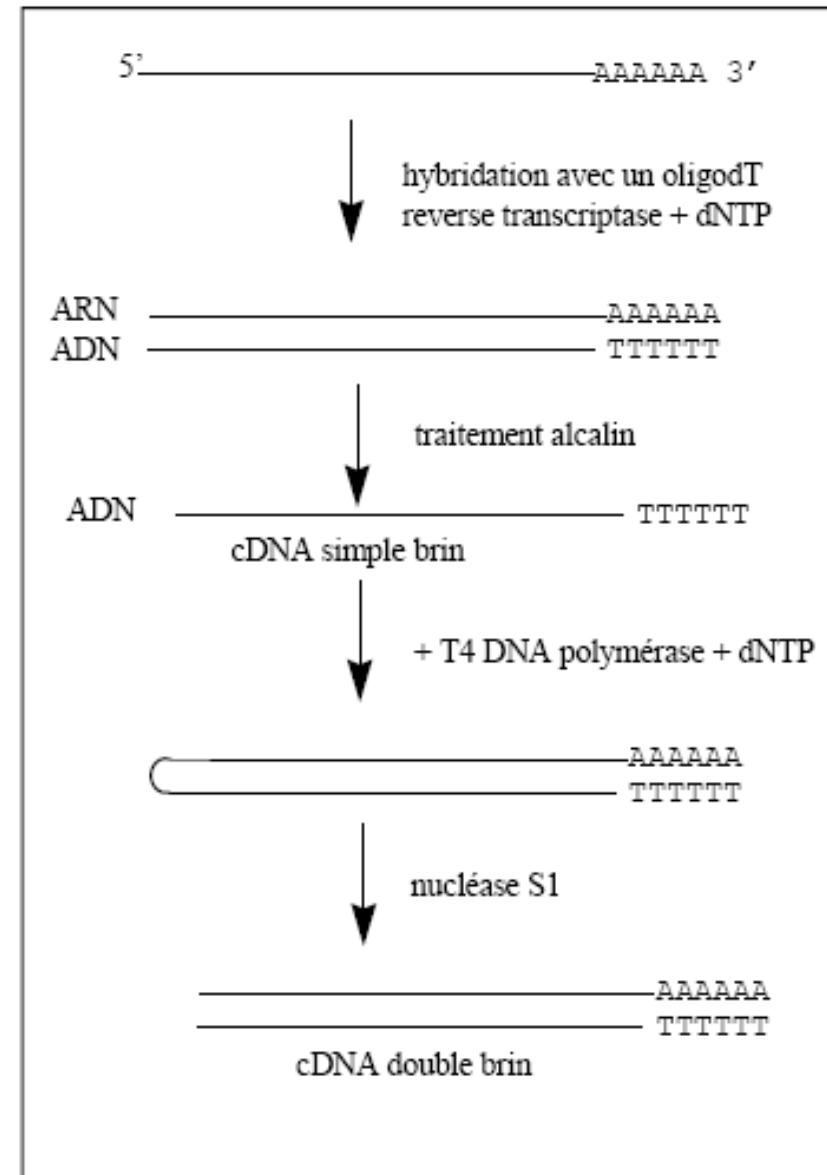


a) Banque d'ADNc

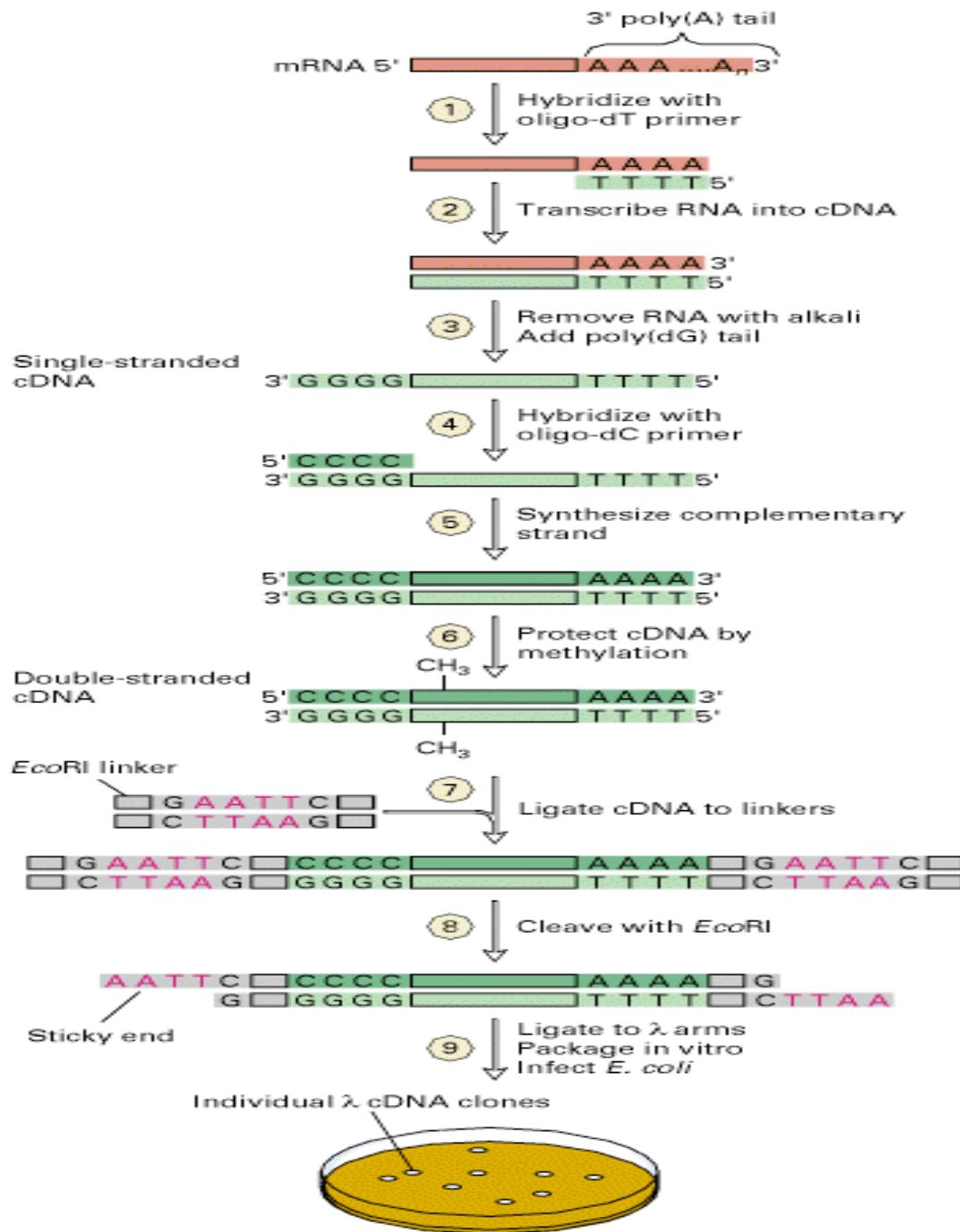
Il faut tout d'abord transformer les ARNm en ADN qui sont alors appelés ADN complémentaires ou ADNc.

Pour la synthèse du premier brin, on utilise une reverse transcriptase (ADN polymérase ARN dépendante) et, comme pour toutes les ADN polymérases, une amorce, qui est ici un oligonucléotide (oligodT). On détruit ensuite l'ARN par un traitement alcalin.

Lorsque l'extrémité 5' de l'ADN se retourne et s'hybride sur lui-même en faisant une boucle en épingle à cheveux, on a une extrémité double brin qui peut servir d'amorce à une DNA polymérase ADN dépendante. On fait donc agir cette enzyme. On obtient donc un ADNc double brin avec une extrémité en épingle à cheveux. Une telle structure ne peut pas être intégrée dans un vecteur. Pour avoir une extrémité franche on fait agir une DNase dégradant le simple brin (nucléase SI).



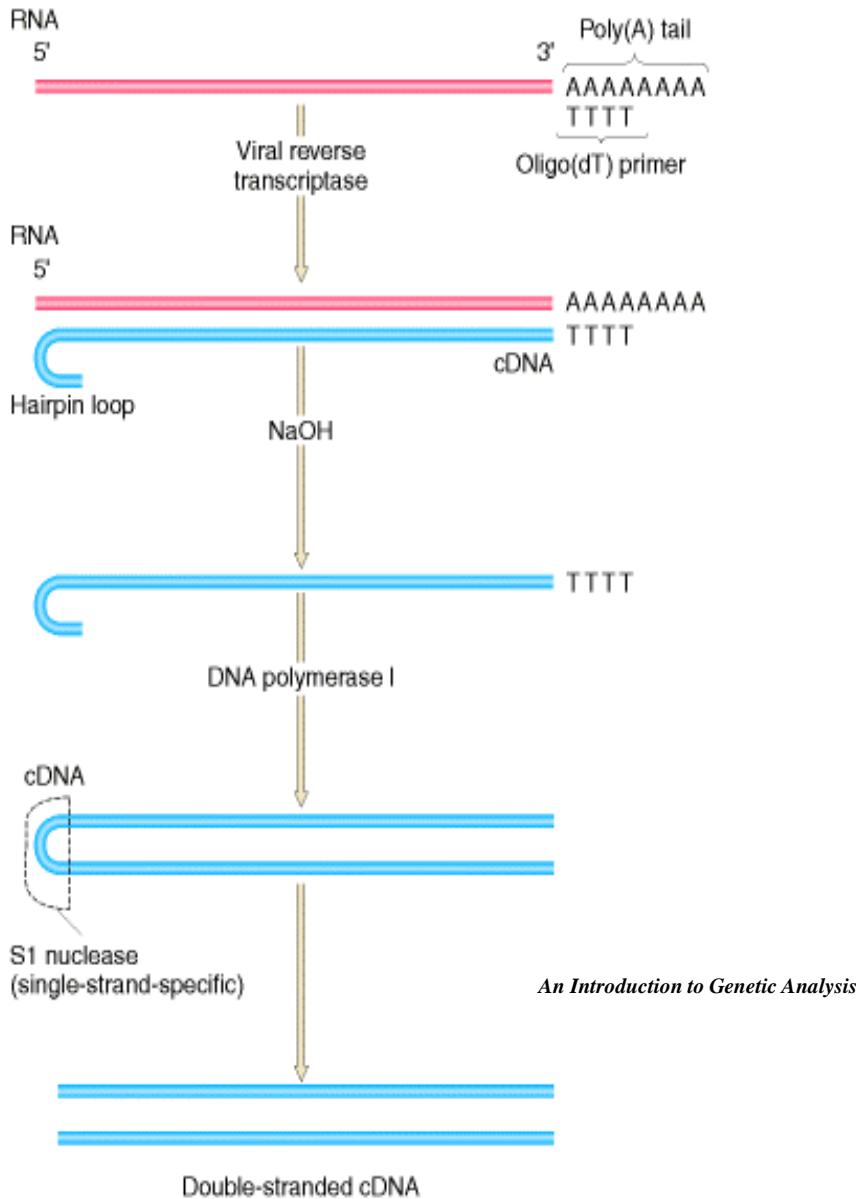
Banque d'ADNc



Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

A partir de
l'ARN:

Principe de la
"reverse
transcription":



b) Banque génomique

Une banque génomique représente l'ensemble du génome. On prépare donc de l'ADNg et on le coupe par une enzyme de restriction de façon à obtenir des fragments de 20 kb se recouvrant.

Pour ce faire, on utilise une enzyme qui coupe fréquemment dans le génome telle que Sau3A qui reconnaît la séquence /GATC. Cette enzyme reconnaît 4 bases et coupe donc en moyenne toutes les 44 bases soit environ toutes les 200 bases.

Si la digestion est complète, les fragments sont trop petits pour être utilisables dans une banque, on préfère avoir des fragments plus grands et surtout se recouvrant. On effectue donc une digestion partielle en utilisant peu d'enzyme de façon à obtenir des fragments de 20kb.

Même si la digestion est bien calibrée, une digestion partielle ne donne pas que des fragments de 20 kb mais aussi des fragments plus petits et plus grands.

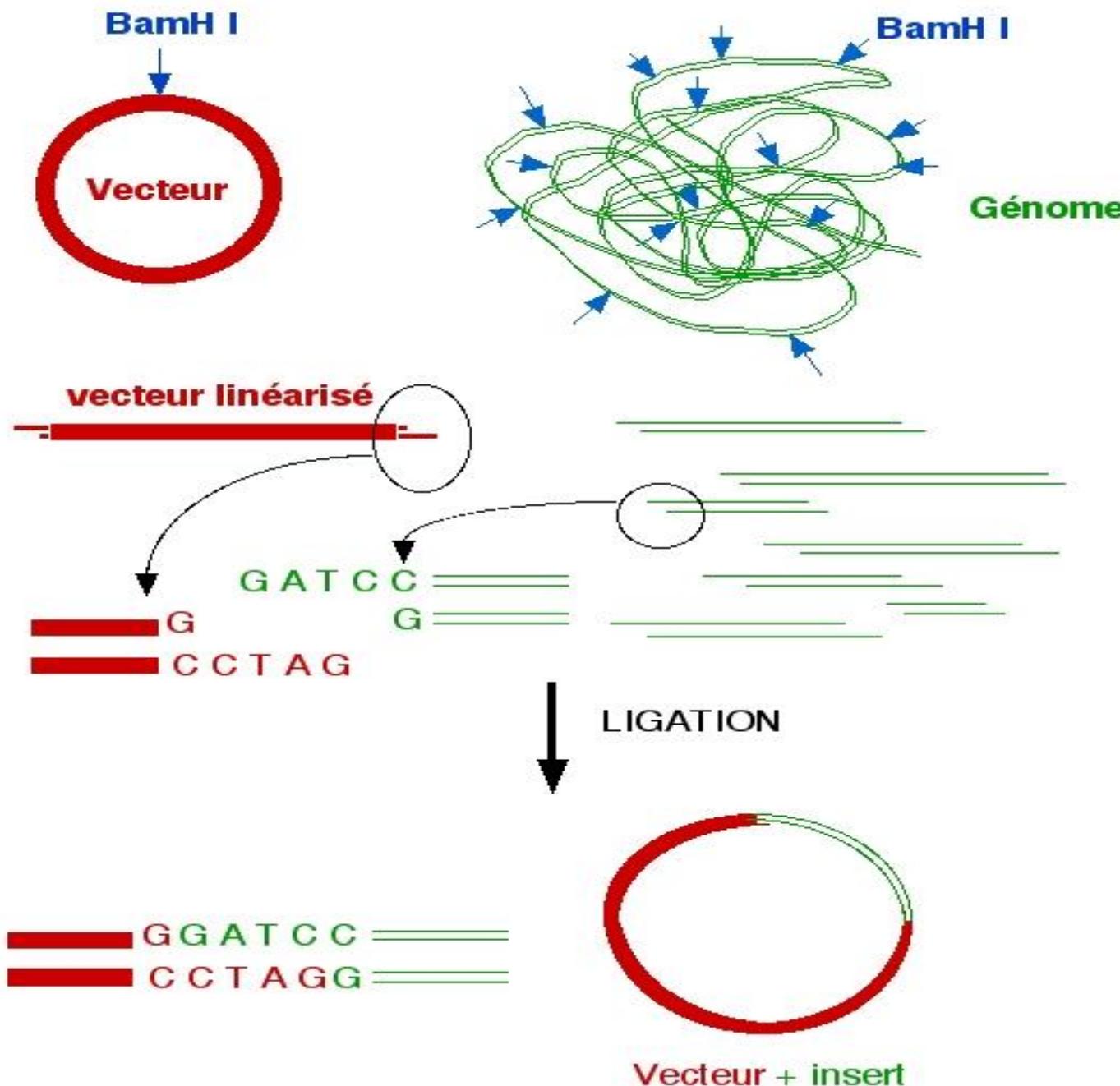
Cet ADN est borné par des extrémités 5' sortantes GATC générées par la digestion par Sau3A. Cette population de fragments d'ADN sera ensuite liquée aux bras droit et gauche d'un lambda obtenus par digestion par BamH1 (G/GATCC) générant des extrémités GATC, compatibles avec Sau3A. Après transformation par empaquetage *in vitro*, on obtient une population de phages dont les inserts représentent l'ensemble de l'ADN génomique.

Dans certains cas la digestion de l'ADN est difficile du fait de la méthylation de l'ADN ou de la présence d'inhibiteur de la digestion qu'il n'a pas été possible d'éliminer lors de la purification de l'ADN. Dans ce cas on coupe l'ADN au hasard par sonication. Les extrémités seront rendues franches par action de la mung bean nucléase.

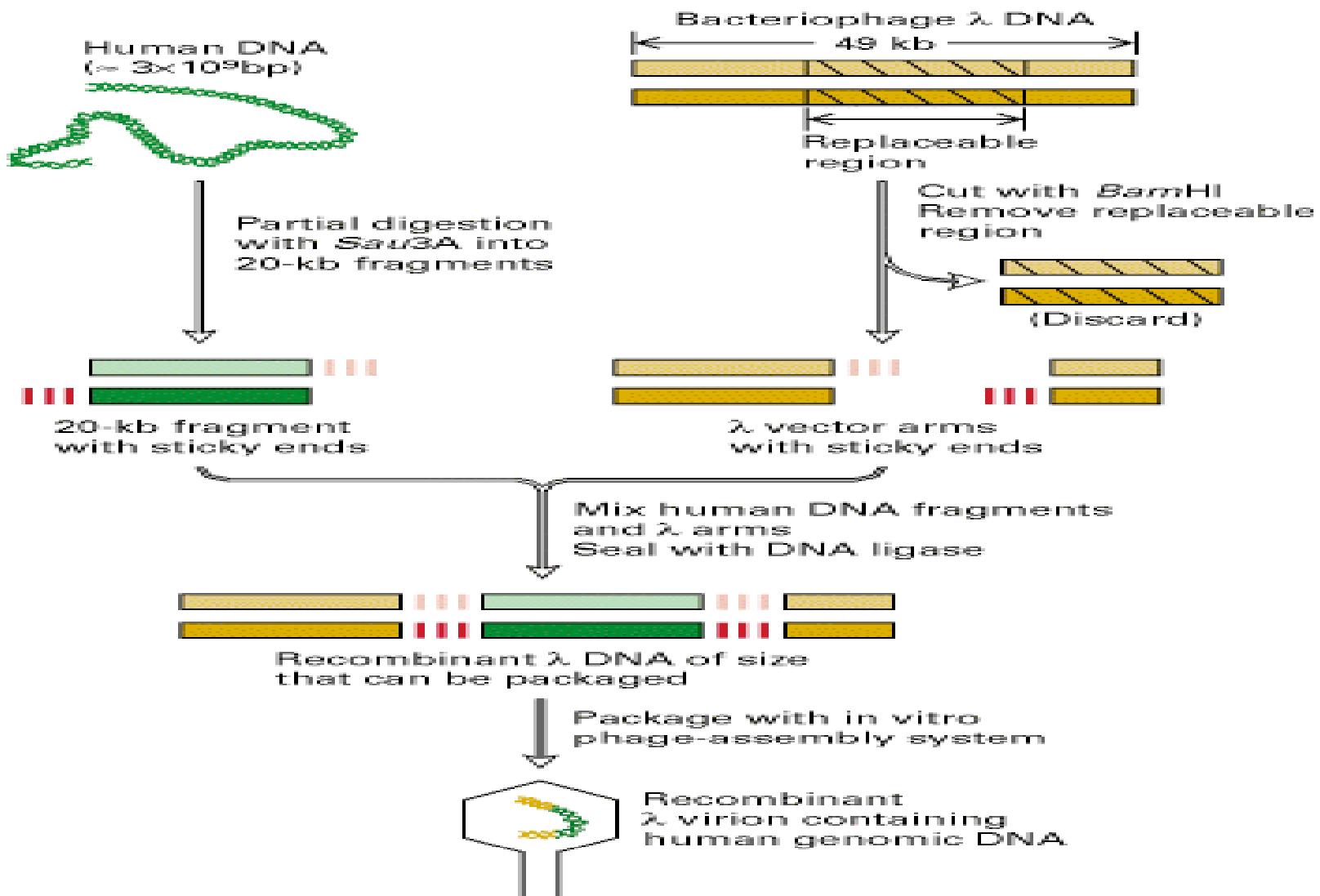
Cette enzyme est préférée aux polymérases ou à la nucléase S1 car elle ne reconnaît pas les nicks qui dans ce cas sont nombreux. Les fragments d'ADN sont alors liqués dans un vecteur soit directement soit après avoir ajouté des extrémités cohésives.

Selon la longueur des inserts que l'on veut obtenir, on utilise différents vecteurs < 5kb : plasmide, 16-22 kb : phage λ, 42-50 kb : cosmide, 100-300 BAC, YAC > 300

Principe du clonage (cas d'une banque génomique)



Banque (librairie) d'ADN génomique



Purification des acides nucléiques

Dégradation des protéines

Dans le cas de la purification de l'ADN, la protéinase K est le plus souvent utilisée, et ce, en présence d'un détergent dénaturant. La digestion est effectuée en présence d'EDTA pour éviter l'action des DNases.

Pour l'ARN, des agents fortement dénaturants tels que les sels de guanidium sont utilisés. Ils ont comme rôle de dénaturer les protéines et en particulier les RNases.

Précipitation et élimination des autres composants de la cellule

Le phénol précipite les protéines

Le CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) est un détergent cationique qui précipite les protéines et les polysaccharides. Ces polysaccharides sont présents en quantité plus ou moins grande chez les plantes.

Chromatographies

L'ADN peut s'accrocher sur des résines échangeuses d'ions, sur de la silice ou de la magnétite (Davies et al., 1998)

-sur colonne d'échange d'ions, l'ADN s'accroche à faible force ionique et est élué à forte force ionique.

sur silice (SiO_3) comme sur magnétite (Fe_3O_4), l'ADN est fixé à forte force ionique (2M NaI), la colonne est lavée par de l'alcool 50% et l'ADN peut être élué par de l'eau. L'ADN est donc directement utilisable pour les réactions suivantes.

L'ARN messager peut s'accrocher par hybridation sur colonne d'affinité sur laquelle on a fixé un oligodT comme ligand.

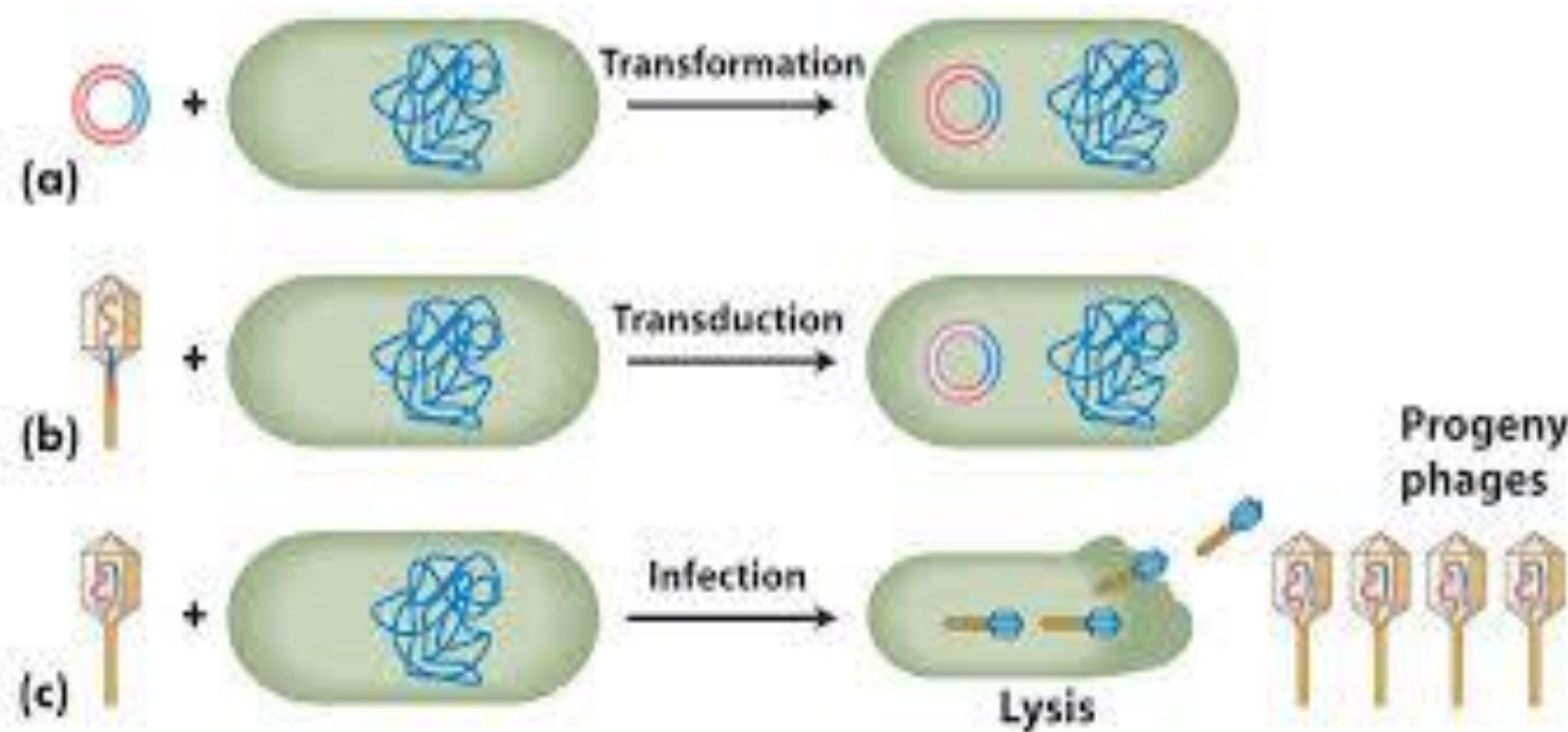
Récupération d'un fragment d'ADN d'un gel d'électrophorèse

« Freeze-squeeze » méthode: la bande est découpée, refroidie à -80°C et centrifugée. On récupère environ 50 % de l'ADN pour des fragments d'ADN d'environ 500 pb.

Papier DEAE : une bande de papier DEAE est placée en aval de la bande à récupérer sur le gel. La migration continue mais lorsque l'ADN arrive sur le papier, il reste bloqué sur le papier. Le papier est alors récupéré, lavé avec un tampon à faible force ionique puis élué avec un tampon contenant 1M NaCl.

Electroélution : dans les protocoles les plus simples, la bande est découpée puis placée en présence de tampon dans un boudin de dialyse. L'ensemble est placé dans un appareil d'électrophorèse, la bande migre hors du morceau de gel mais reste dans le tampon du boudin de dialyse. Des appareils ont été fabriqués pour récupérer les fragments d'ADN par électroélution. La bande est mise dans le réservoir de la cathode, l'ADN migre, sort de la bande, est pigée dans un réservoir intermédiaire contenant un tampon à haute force ionique.

Chapitre 4: La transformation génétique et le criblage.



En biotechnologie, le génie génétique est utilisé à des fins commerciales comme pour la production de nouveaux vaccins, des grandes quantités de protéines valorisables, ou l'introduction de gènes spécifiques dans un organisme animal ou végétale. Dans chaque cas, le choix de l'hôte est essentiel puisqu'il nous orientera vers un type de vecteur adapté.

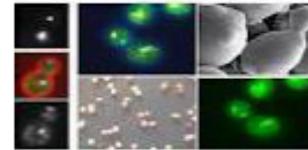
1- L'hôte idéal

Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit:

- Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- Être non pathogène.
- Être capable d'incorporer l'ADN.
- Être stable en culture
- Possède des enzymes appropriées pour la réPLICATION du vecteur.

Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés, génétiquement manipulables.

Tab. : Hôtes de clonage moléculaire.

<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Prokaryotes		Eucaryotes
Bacille à Gram – 	Bacilles à Gram + Spore + 	
Avantages		
- Génétiquement très bien connue. - Nombreuses souches disponibles - Prokaryote le plus connu	- Facilement transformable - Non pathogène - Protéines secrétées naturellement - Formation d'endospores facilitant les cultures.	- Génétiquement très bien connue - Non pathogènes - Assure la maturation des ARNm et des protéines - Facile à cultiver.
Inconvénients		
- Potentiellement pathogènes - Périplasme piégeant les protéines	- Génétiquement instable - Génétique moins connue qu' <i>E. coli</i>	- Plasmides instables - Pas de réPLICATION pour la plupart des plasmides prokaryotes.

Il faut noter que *E. coli* est l'organisme le plus utilisé en clonage moléculaire. Malgré que cette bactérie soit comptée parmi la flore normale de l'intestin de l'homme et les animaux, il est aussi un pathogène potentiel (surtout les souches sauvages). Et aussi la synthèse d'endotoxines (LPS) susceptible de contaminer les produits finis, cela constitue un problème potentiel notamment pour les produit pharmaceutiques administrés par voie intraveineuse.

Aussi le problème, que *E. coli* retiens des protéines extracellulaires dans son espace périplasmique, ce qui peut rendre l'isolement et la purification des protéines recombinantes difficiles et coûteuse.

Avec *Bacillus subtilis* l'inconvénient majeur reste la difficulté de maintenir la réplication plasmidique dans les sous cultures, ce qui engendre souvent la perte de l'ADN cloné.

Des vecteurs plasmidique et des YAC (Yeast Artificial Chromosome) ont été développés pour le clonage dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'avantage que présente cet hôte est qu'il possède les ARN et les systèmes post traductionnels complexes nécessaire à la synthèse de produits de gènes d'organismes supérieurs. Les processus post traductionnels peuvent être à l'origine de problème de clonage.

La culture de cellules de mammifères présente un coût élevé et des difficultés de production à grande échelle. En plus le niveau d'expression des gènes clonés est souvent faible (aussi pour les insectes, plantes, etc.).

On dit dans les cas des bactéries **transformation**, le processus d'intégration de l'ADN étranger, mais pour les eucaryotes on dit la **transfection**. Car, la transformation des cellules de mammifère désigne habituellement la conversion en cellules malignes (tumorales, cancéreuses). L'exemple le plus connu de l'application de cette caractéristique en biotechnologie est la production des anticorps monoclonaux.

Méthodes d'introduction de l'ADN à cloner dans la cellule hôte

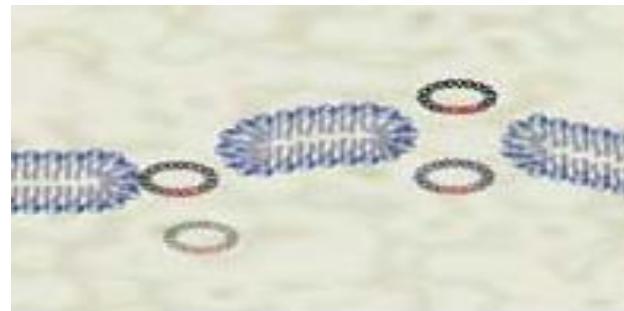
Il y'a plusieurs méthodes sont largement utilisées pour introduire l'ADN dans les cellules hôtes.

1: *Electroporation*

Cette technique implique l'exposition de l'hôte à des décharges électriques afin d'ouvrir les pores (temporairement) dans la membrane par lesquels, l'ADN cloné, ajouté dans le milieu, peut pénétrer sans lyse des cellules (Fig. 1).

- Application
 - Cellules de mammifères en suspension
 - Levure (*S. cerevisiae*)
 - Bactéries (protoplastes *E. coli*)

⌚ Nécessite beaucoup de cellules, 50% de mort



A- Électroporation

The phenomenon of electroporation

B-

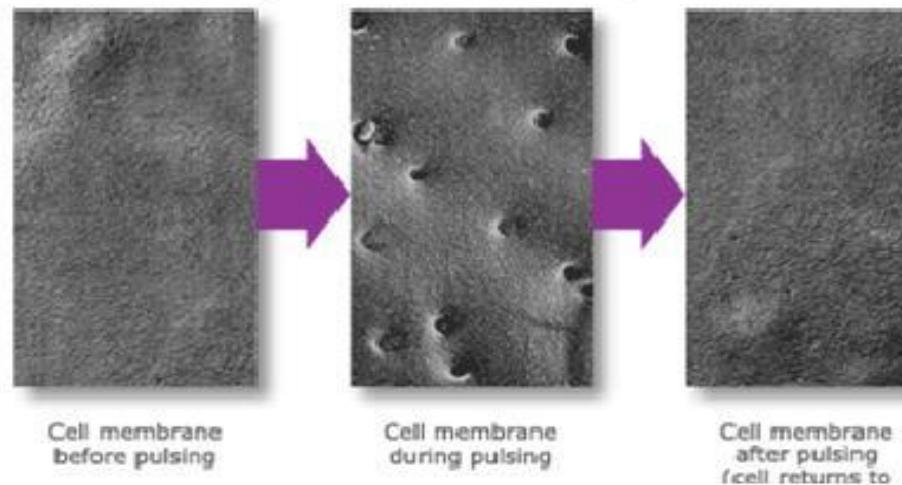
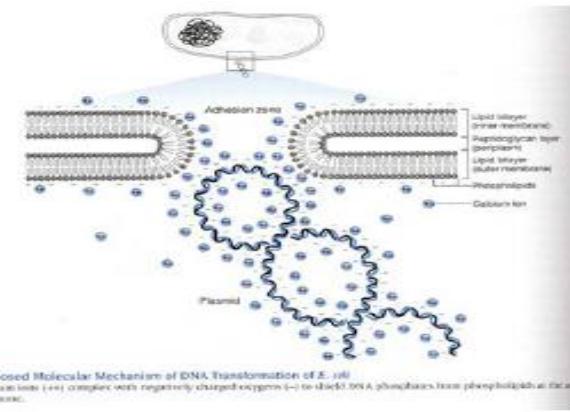


Fig. : A : Représentation graphique des plasmides en passant par les pores aqueux dans la membrane plasmique. **B :** Phénomène d'électroporation.

2. Transformation de la chaleur CaCl₂ : Les cellules bactériennes sont traitées avec du CaCl₂ glacé puis exposées à haute température (42 ° C) pendant environ 90 secondes.



3. Un canon à Particules

La transfection des cellules cibles se fait par des billes métalliques (généralement de tungstène) recouvertes d'acides nucléiques, en perçant parois et membranes plasmiques sans provoquer de lyse cellulaire. Cette technique a été utilisée sur des levures, des algues, des cellules de plantes et même des mitochondries et chloroplastes. De plus contrairement à l'électroporation, cette technique peut être utilisée pour introduire de l'ADN dans des tissus intacts comme des graines de plantes.

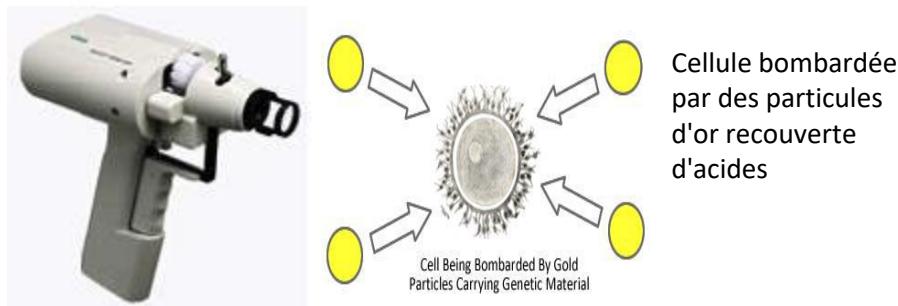
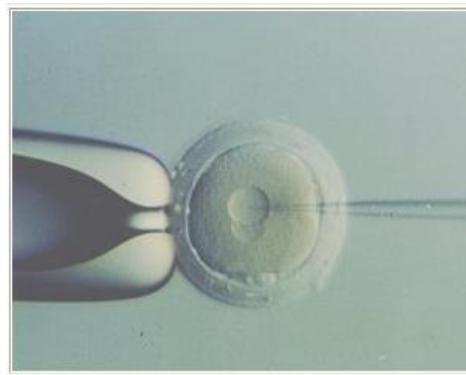


Fig. :Canon à acides nucléique (*biolistics*) pour la transfection d'eucaryotes.

4 .Microinjection

Dans les cellules animales, l'ADN peut être injecté dans le noyau par microinjection.

Fig. :Microinjection des gènes dans le pronucléus mâle d'un ovocyte de lapin

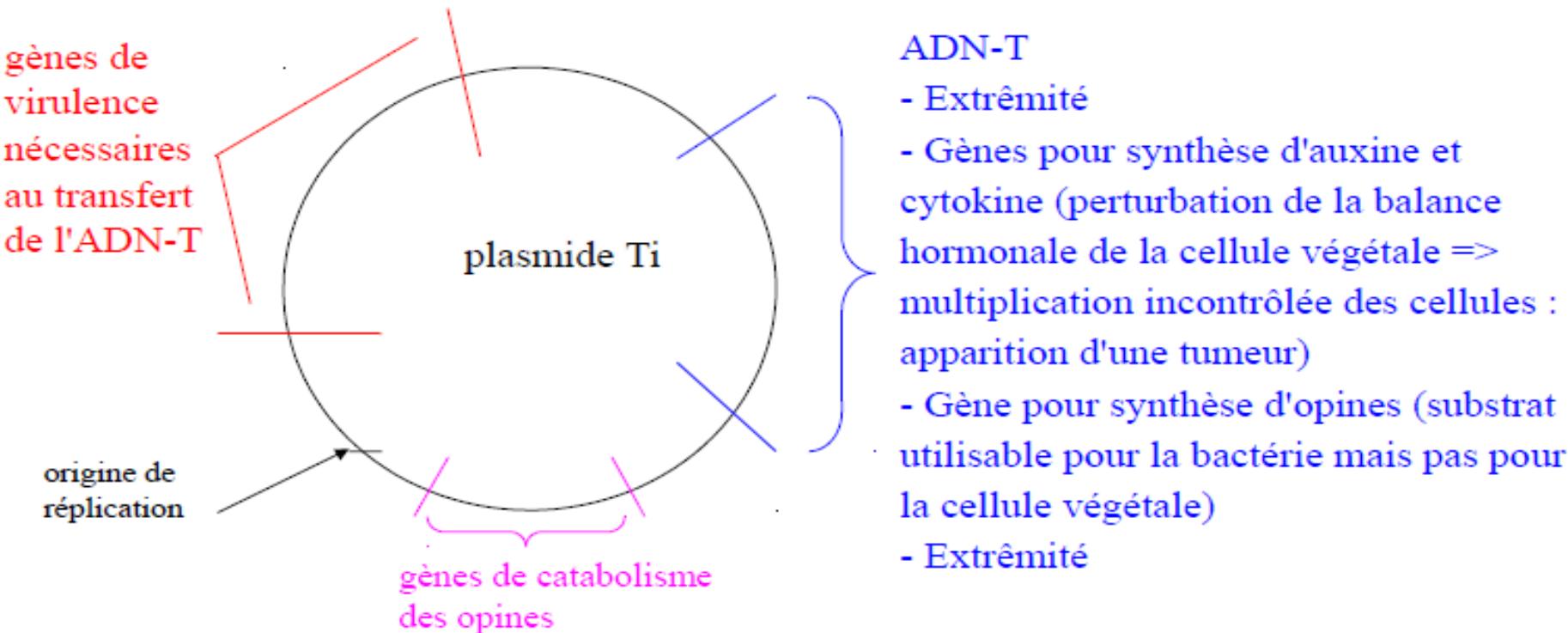


5 Transformation des cellules végétales

a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (bactérie responsable de la galle du collet : développement d'une tumeur au niveau du collet)

Mécanisme naturel : la bactérie possède un grand plasmide Ti (Tumor induction) important pour l'intégration de l'ADN bactérien (ADN-T) dans la plante hôte



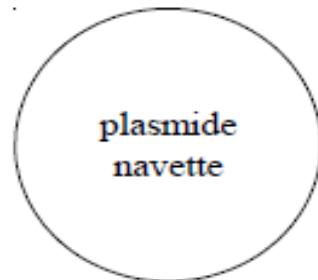
Transformation des cellules végétales

a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Modification du plasmide Ti pour utilisation en biotechnologie :



Plasmide avec les gènes de virulence, mais pas l'ADN-T



Plasmide comportant l'ADN à transférer dans la cellule végétale :

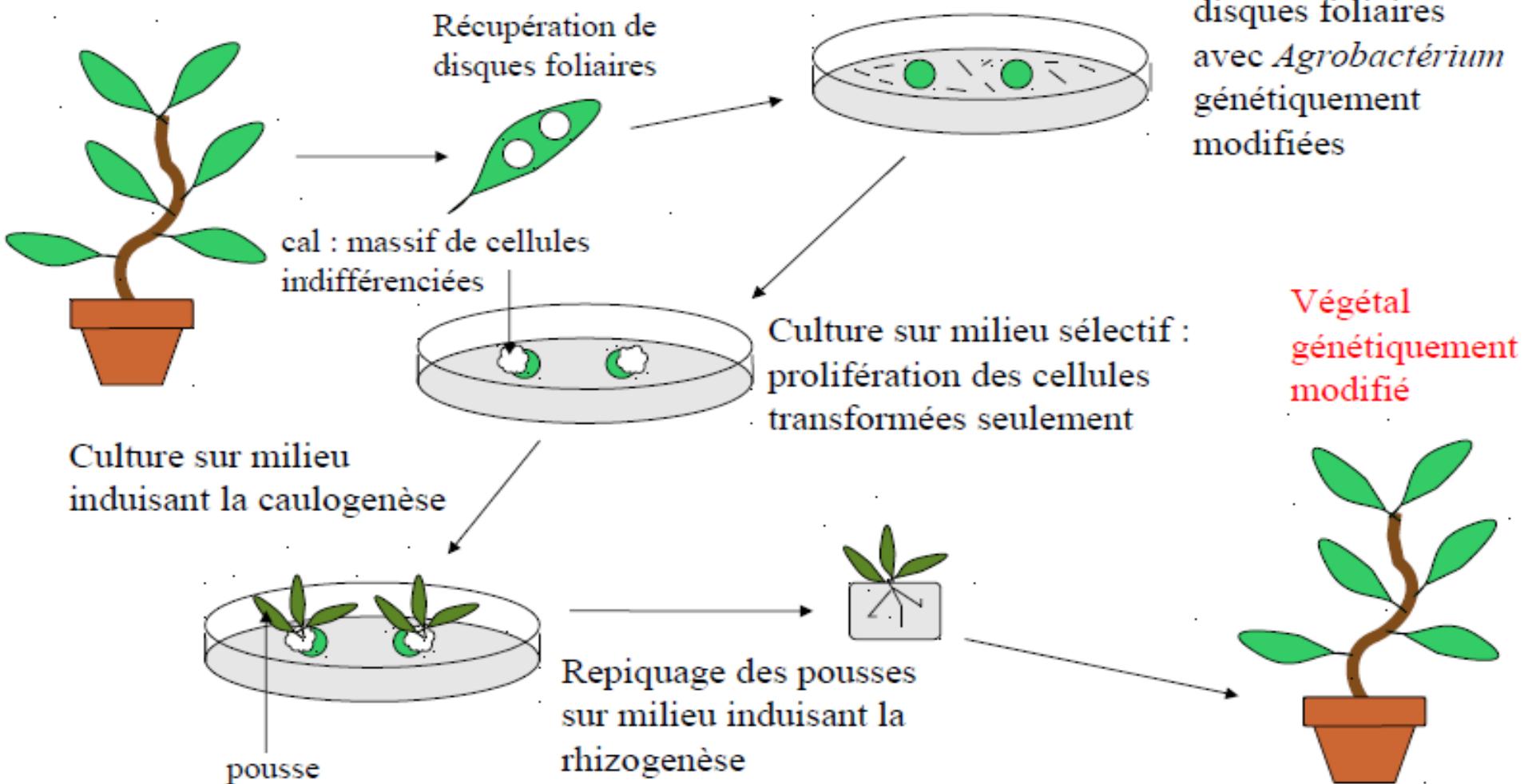
- Extrémités de l'ADN-T bactérien (nécessaires au transfert d'ADN dans la cellule végétale)
- Entre les extrémités bactériennes : gène d'intérêt à transférer
 - + gène de sélection pour criblage des cellules transformées

Vecteurs binaires (plasmide désarmé et plasmide navette) dans *Agrobactérium* : transfert du plasmide navette aux cellules végétales

5 Transformation des cellules végétales

a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Méthode de transformation :



II.Criblage de la banque d'ADN (Détection des recombinants):

a. *Les marqueurs de sélection*

On utilise souvent des antibiotiques pour sélectionner les bactéries transformées.

Selon les molécules, elles seront généralement efficaces pour sélectionner les procaryotes ou les eucaryotes, mais certaines d'entre elles seront efficaces pour les deux types cellulaires et pourront donc être utilisées dans les vecteurs utilisés successivement en procaryote et en cellule eucaryote (on parle de vecteur navette).

On peut utiliser des antibiotiques toxiques pour les bactéries et un gène de résistance porté par le plasmide pour sélectionner les bactéries qui ont été transformées. On peut aussi utiliser des protéines toxiques.

La nécessité de cela découle de l'inefficacité de la ligature et de la transformation bactérienne.

Même avec les systèmes à haute efficacité qui sont maintenant disponibles pour *E. coli*, seulement environ 1% des cellules bactériennes absorbent réellement l'ADN.

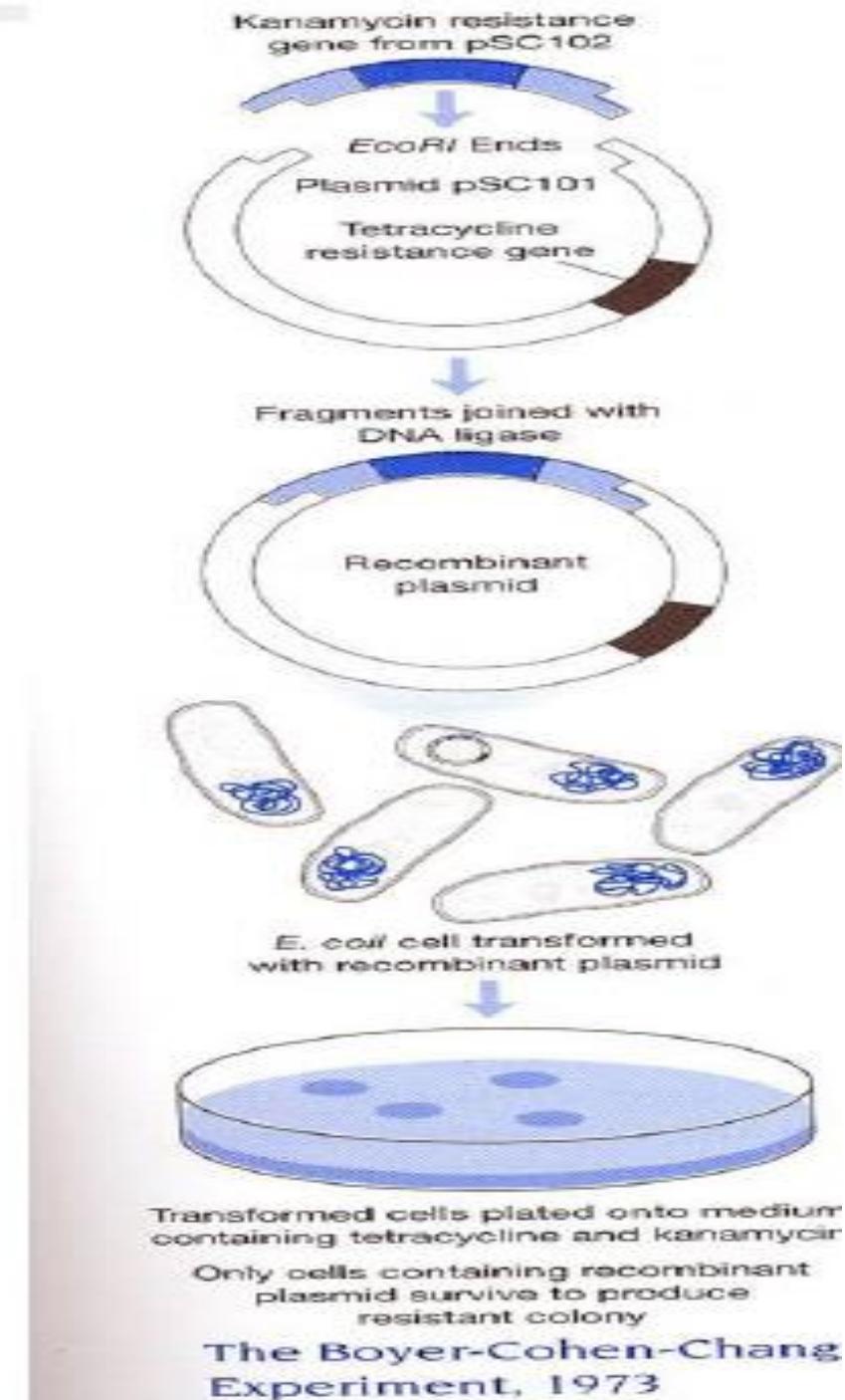
Importance des marqueurs:

- 1- Pour empêcher la croissance des cellules non transformées.
- 2- Différencier les cellules transformées contenant des plasmides avec les inserts d'ADN souhaités de celles avec les plasmides sans inserts d'ADN

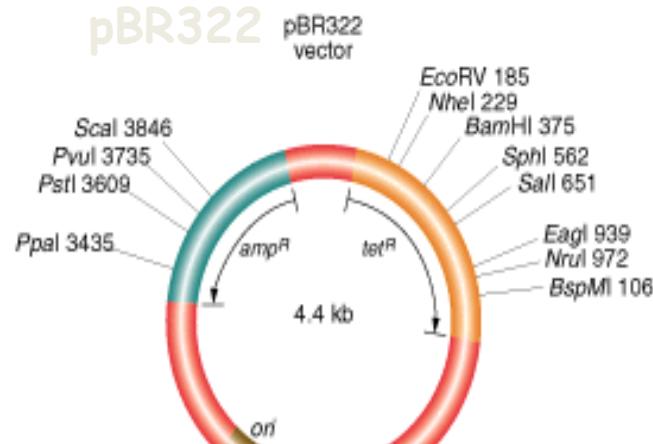
➤ Marqueurs de sélection: gènes résistants aux antibiotiques

1. Le gène de résistance aux antibiotiques sur le vecteur plasmidique peut simplement être utilisé comme marqueur pour une transformation réussie. Étaler le mélange de transformation sur une plaque de gélose contenant l'antibiotique pertinent, et seuls les transformants pourront croître.

2. Un deuxième gène résistant aux antibiotiques peut également être inclus dans le segment d'ADN inséré.



Criblage des clones intéressants (1)

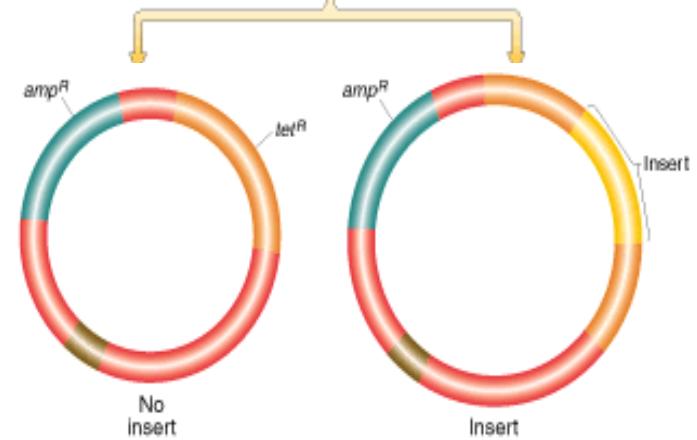


Cut foreign DNA and vector with, say, *SaiI*

Transform bacteria

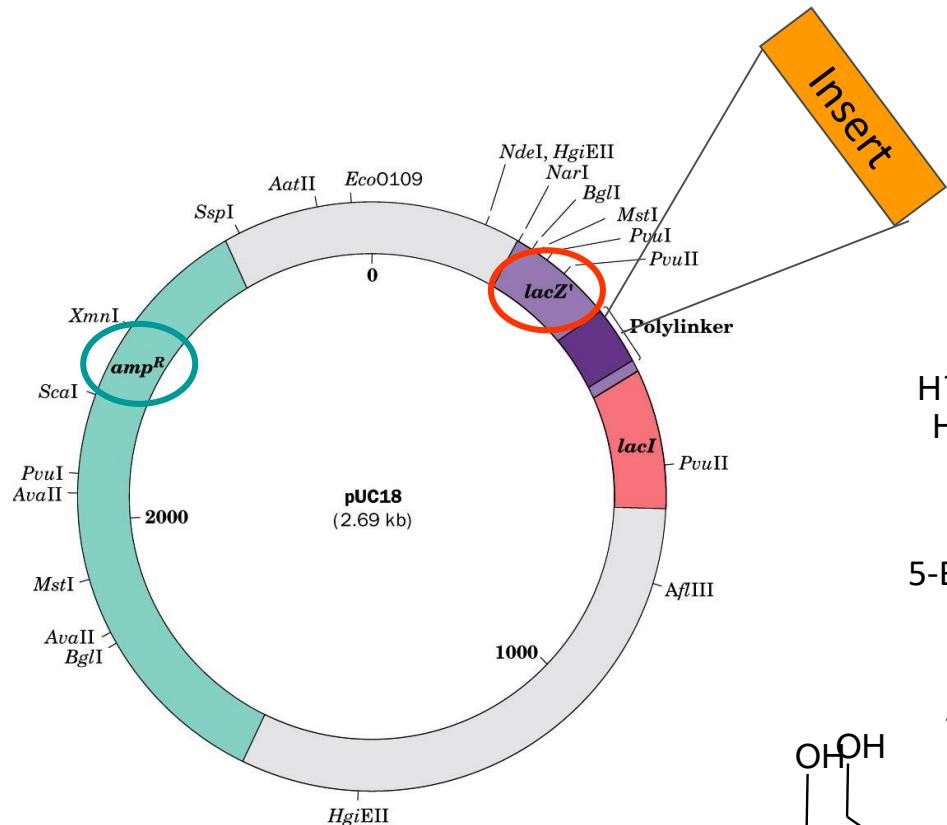
Plate on ampicillin

Amp^R
Tet^R

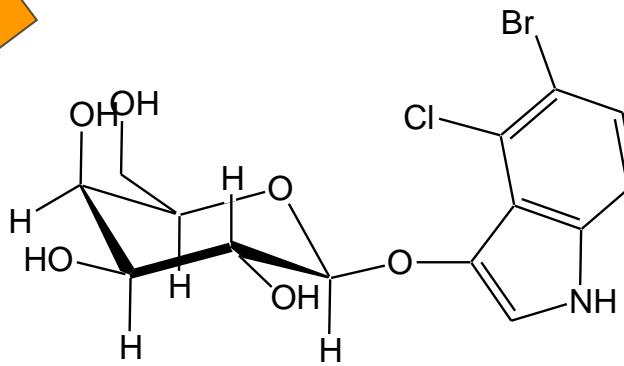


Amp^R
Tet^S
Clone intéressant

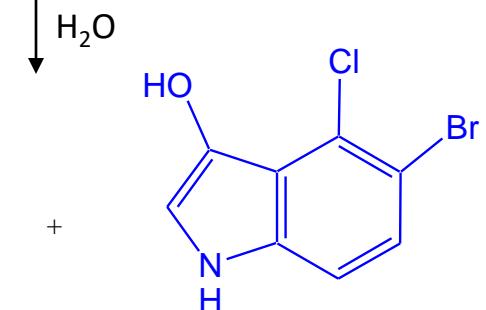
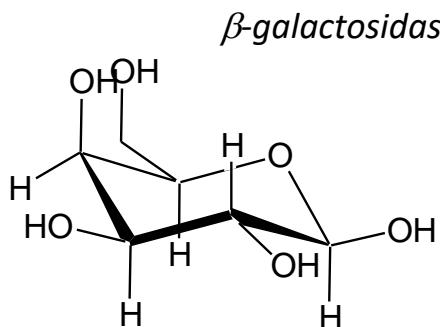
Les cellules transformées avec le vecteur contenant l'insert doivent pouvoir être identifiées



lacZ' : fragment de β -galactosidase



5-Bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactoside (**X-gal**)
(incolore)



5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindole
(bleu)

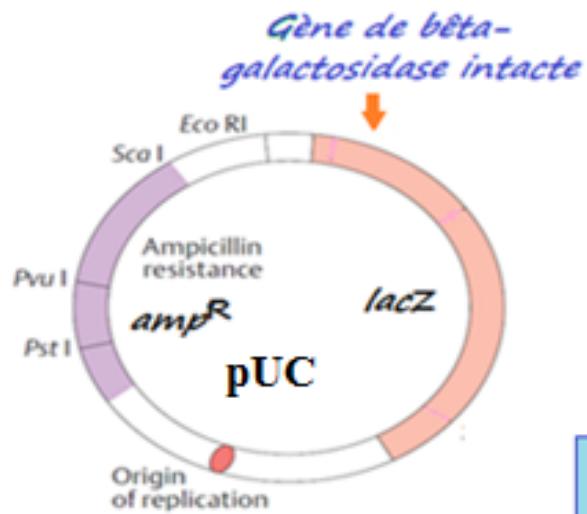
-> **criblage blanc-bleu:**

sans insert -> colonies bleues

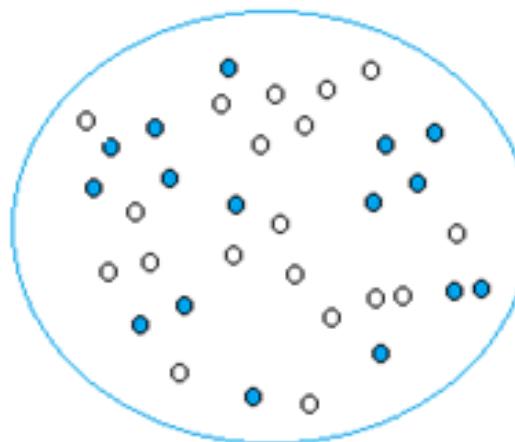
avec insert -> colonies blanches

➤ Marqueur de Sélection : Lac Z Gene

- Le milieu dans la boîte de Pétri contient un antibiotique et le produit chimique X-gal.
- Xgal, lorsqu'il est métabolisé par la bêta-galactosidase produite par le gène Lac Z dans le vecteur plasmidique, produit un produit bleu.
- Seules les colonies bactériennes contenant un plasmide avec le gène de résistance aux antibiotiques peuvent se développer.
- De ces colonies, celles avec un gène Lac Z intact (et donc sans insert) produiront des colonies bleues. Ceux qui ont un gène LacZ perturbé (et donc avec un insert) sont incapables de métaboliser Xgal et de produire des colonies blanches.
- Les colonies blanches contiennent donc des plasmides recombinants:



Introduction dans la cellule hôte Ex. *E. coli*



Colonies colorées en bleu

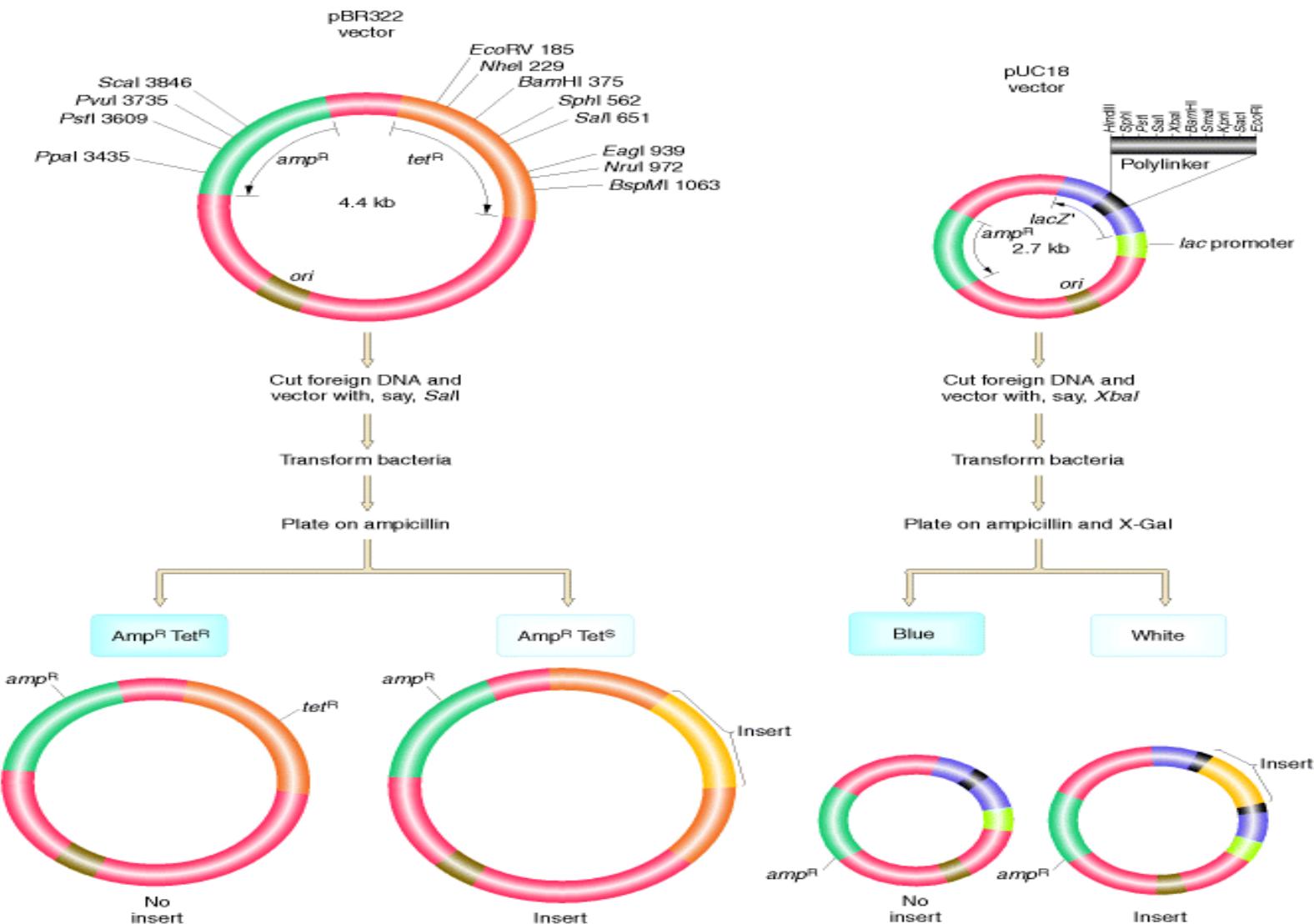
"Bactérie contenant un vecteur intacte"

Colonies colorée en blanc

"Bactérie contenant le gène d'intérêt"

Criblage -screening- des clones intéressants (2)

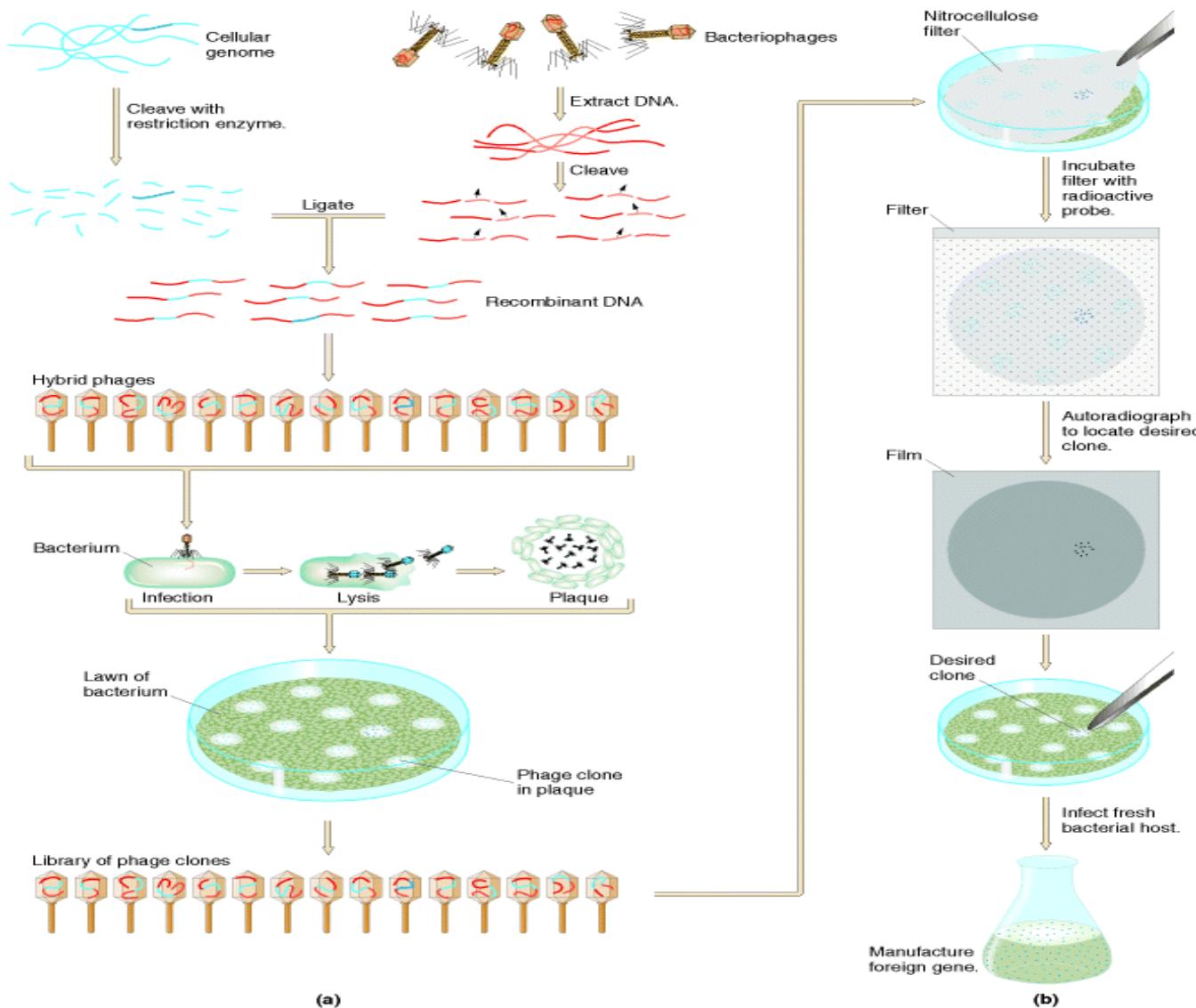
Test blanc-bleu (α -complémentation)



2.Criblage par hybridation

Une sonde marquée (ADN = fragment de restriction, oligonucléotide synthétique, ou ARN) peut être hybrideée à l'ADN des clones de la banque après transfert sur filtre Noter que l'on constitue une réplique des boîtes portant les clones (colonies bactériennes ou phages) sur un filtre avant de les lyser : la distribution géométrique des clones est conservée, et l'on peut remonter du signal observé en autoradiographie à un clone d'où l'on peut extraire l'ADN recherché.

Criblage d'une banque phagique



Hybridation
avec une
sonde
spécifique...