

# Le clonage moléculaire et les vecteurs de clonage

1/ Définition

2/ Utilisation d'un vecteur

3/ clonage orienté et clonage non orienté

4/ Les différents vecteurs

A – Les plasmides

a - plasmides de 1ère génération

b - plasmides de 2ème génération

c - plasmides de 3ème génération

d – Plasmides de 4ème génération

# Le clonage moléculaire et les vecteurs de clonage

B – Les bactériophages

a – Le bactériophage  $\lambda$

b - phage M13

c - Systèmes hybrides : Les Phagemides

d - Systèmes hybrides : Les cosmides

C – Les vecteurs eucaryotes

D – les vecteurs viraux

5/ Les chromosomes artificiels

a – les YACs (Yeast Artificial Chromosome)

b – les BACs (Bacterial Artificial Chromosome)

# Le clonage moléculaire

## 1/ Définition

C'est la recombinaison in-vitro d'un fragment d'ADN avec un **vecteur** se répliquant de manière autonome dans une cellule hôte.

La culture de cette cellule contenant le vecteur **recombiné** permet l'amplification et l'isolement de l'ADN inséré.

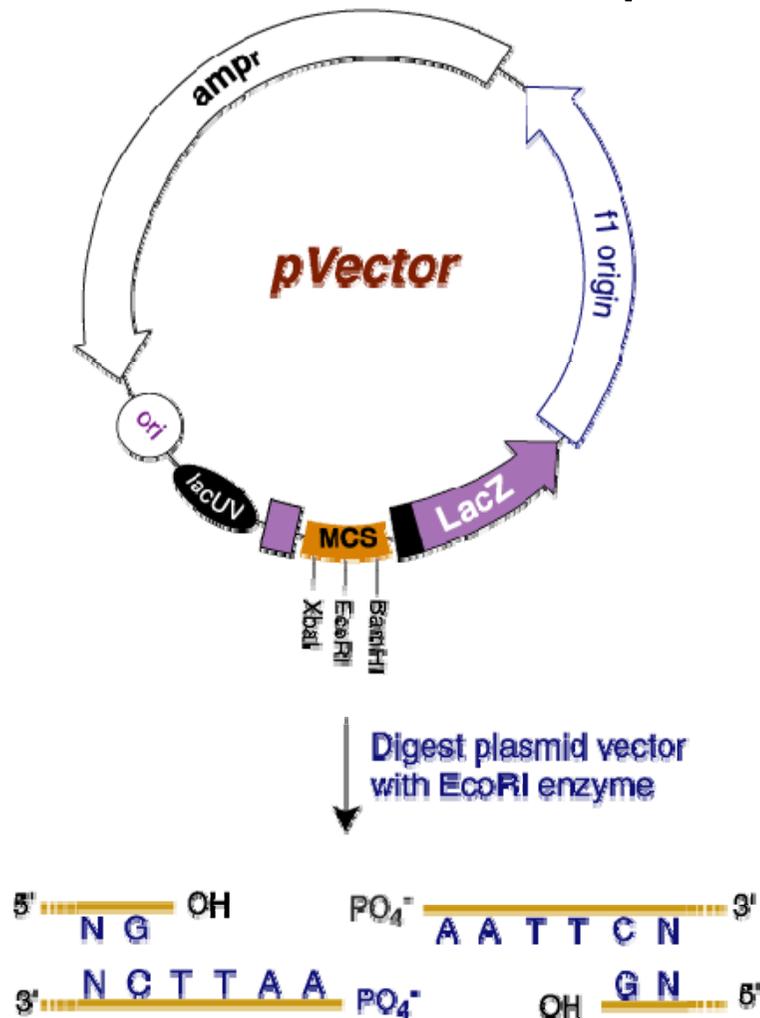
Les propriétés du vecteur :

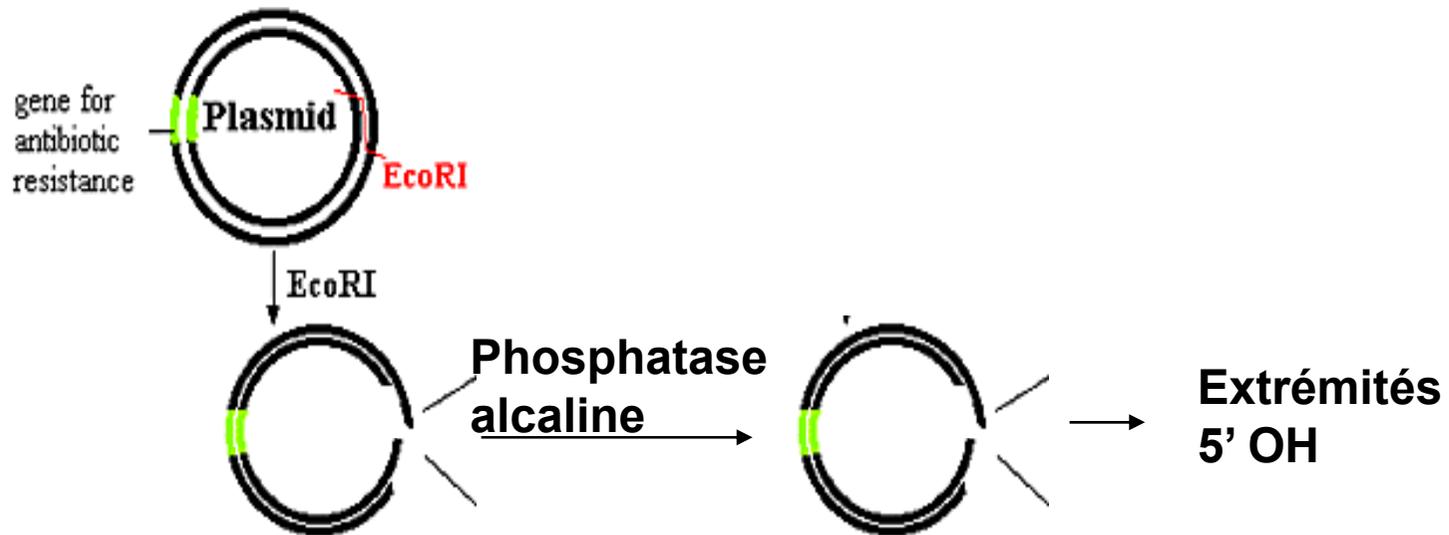
- Il doit se répliquer de manière épisomale et active
- Il doit permettre la sélection des cellules l'ayant incorporé
- Il doit posséder au moins un site unique de restriction pour le clonage du fragment recombinant.

## 2/ Utilisation d'un vecteur

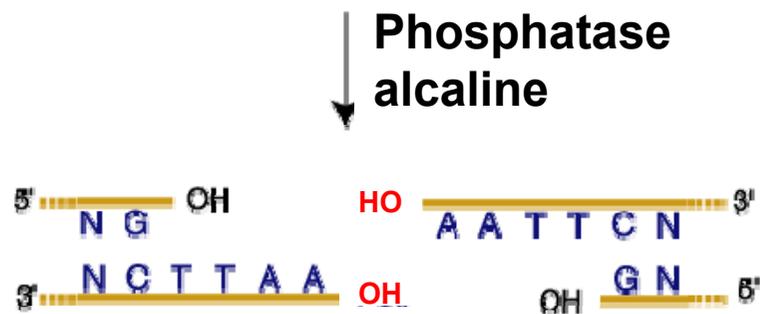
- 1\* préparation du vecteur : coupure du vecteur à l'endroit exact ou l'on désire insérer la séquence à étudier.

→ Choix de l'enzyme de restriction



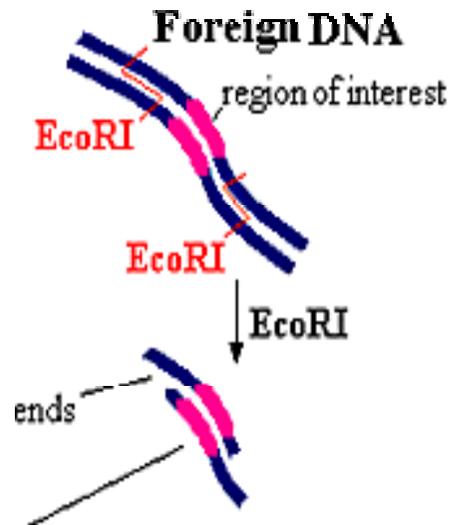


Traitement par la phosphatase alcaline (si digestion par une seule enzyme de restriction)



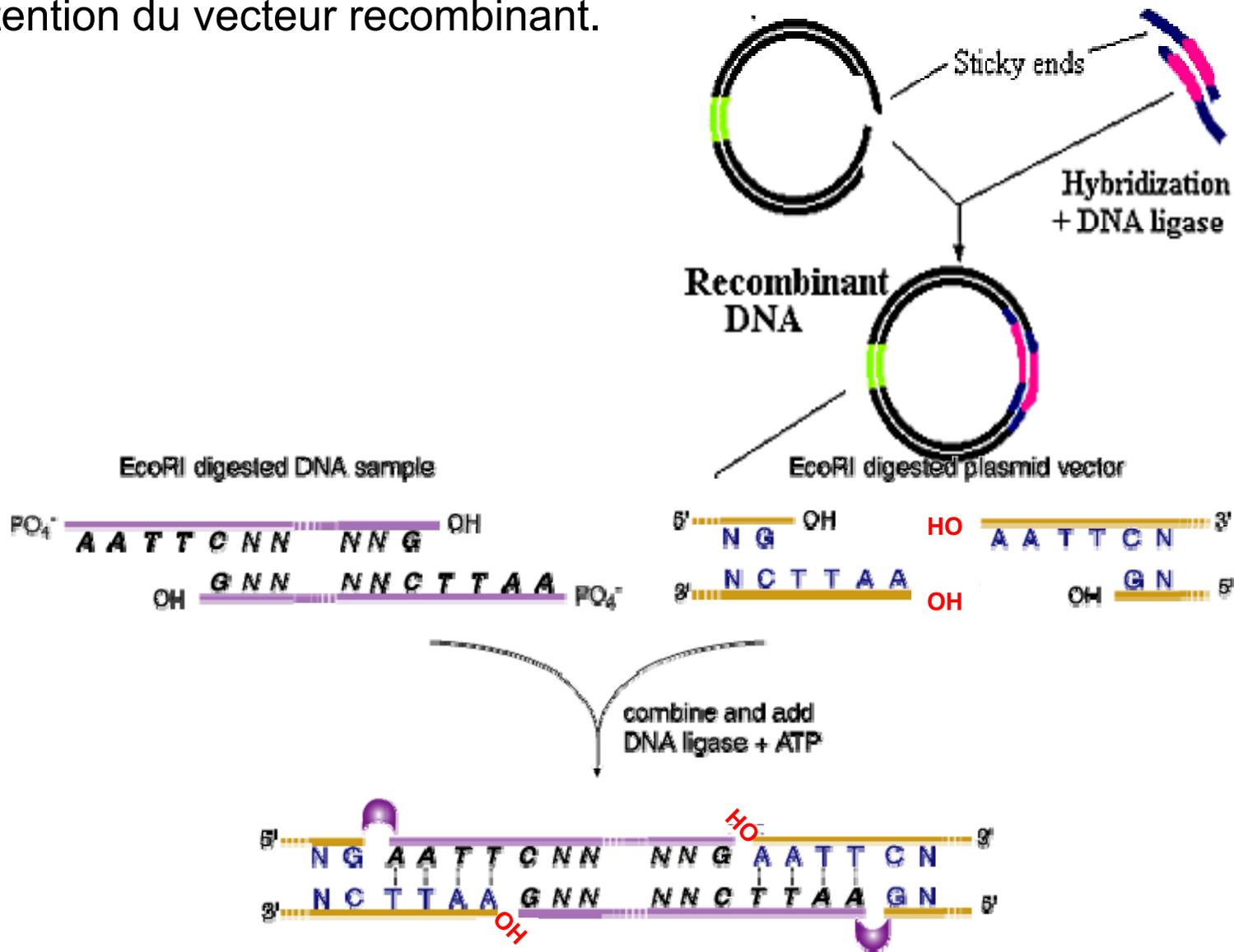
## 2\* préparation de l'ADN à insérer

Taille et extrémités doivent être compatibles avec le vecteur



### 3\* réalisation du recombinant

Mélange du vecteur ouvert et de l'ADN à insérer en présence de ligase+ATP  
 → Obtention du vecteur recombinant.



## 4\* Incorporation à l'hôte et choix de l'hôte

→ Indispensable pour répliquer le vecteur

La plupart du temps : **hôte bactérien.**

Car :

- temps de génération très court (30 minutes)
- utilisation de bactérie non pathogènes (E. coli res-, recA-)

(parfois choix d'un hôte eucaryote cf. plus loin)

→ C'est la **transformation**

# Transformation (artificielle d'E. coli)

2 méthodes :

1) chimique

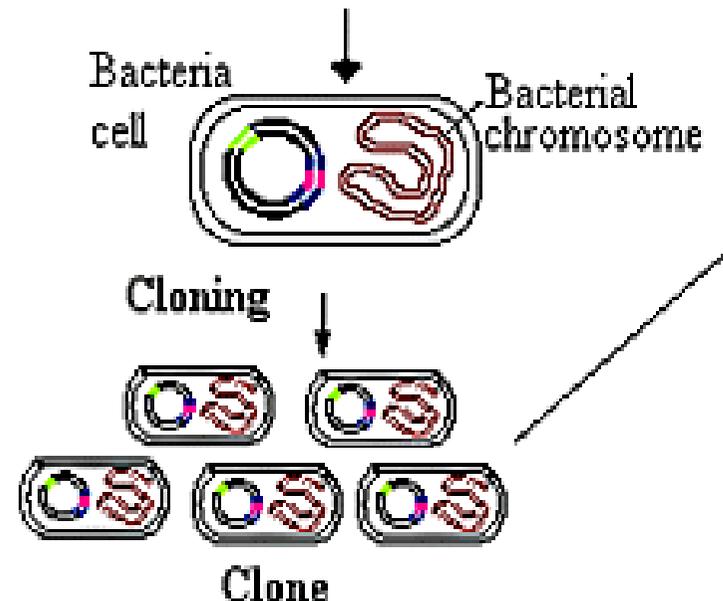
Traitement des bactéries au chlorure de calcium qui perméabilise les membranes

**ou**

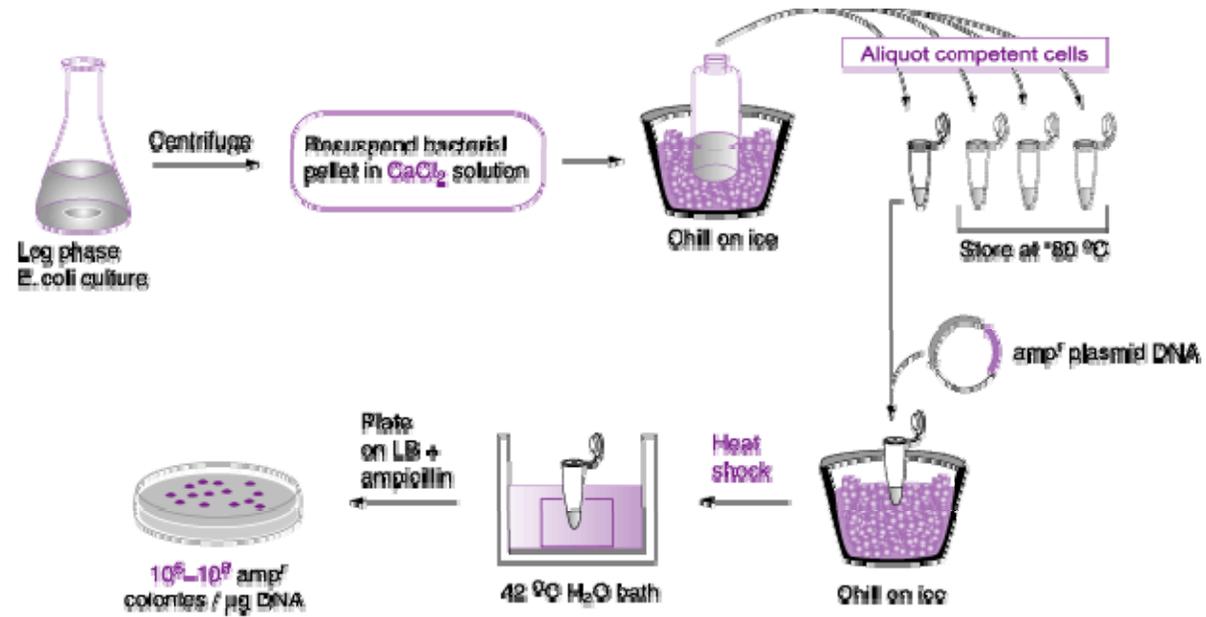
2) physique

Traitement des bactéries par un choc électrique permettant de rendre les membranes perméables

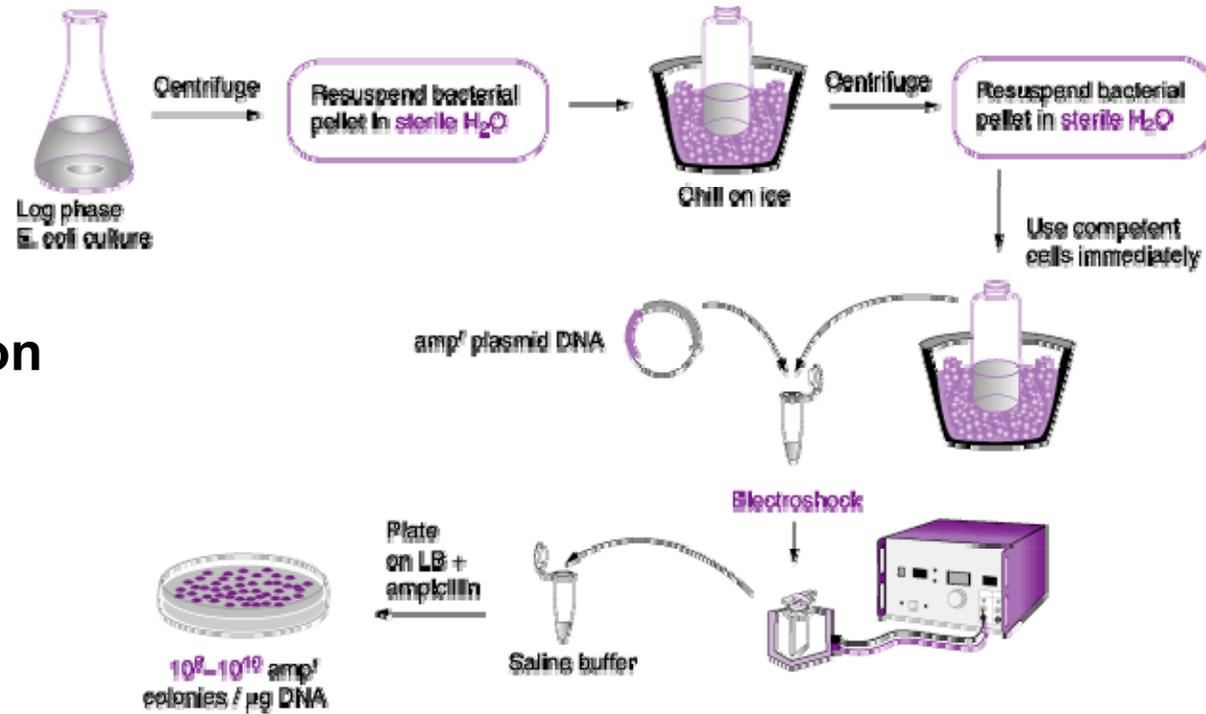
→ Les cellules sont rendues compétentes



# CaCl<sub>2</sub>



# électroporation

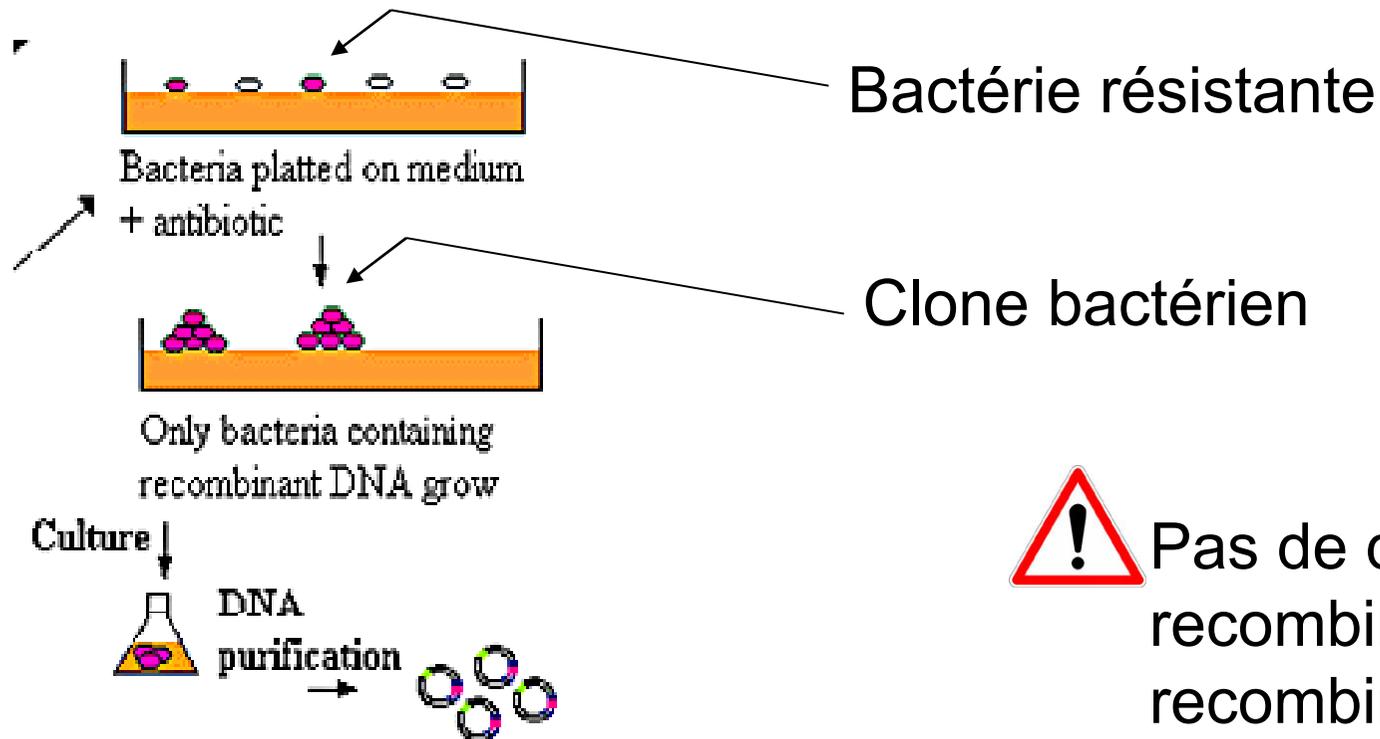


## 5\* Sélection des bactéries recombinantes

Rendement de transformation  $\sim 1 / 10^5 - 10^7$

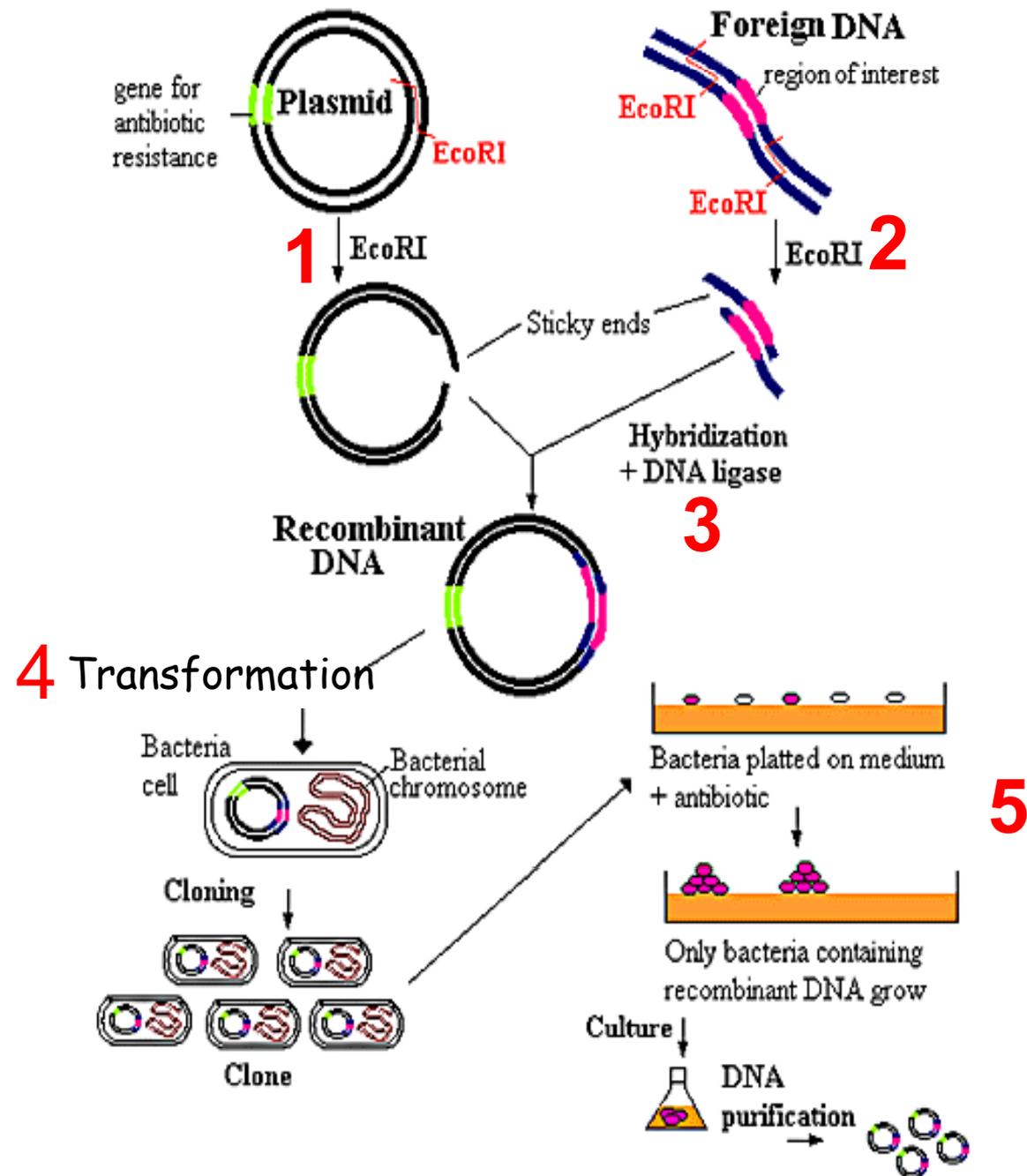
➔ **Nécessité de sélectionner les recombinants**

Culture sur milieu sélectif : le plus souvent un antibiotique

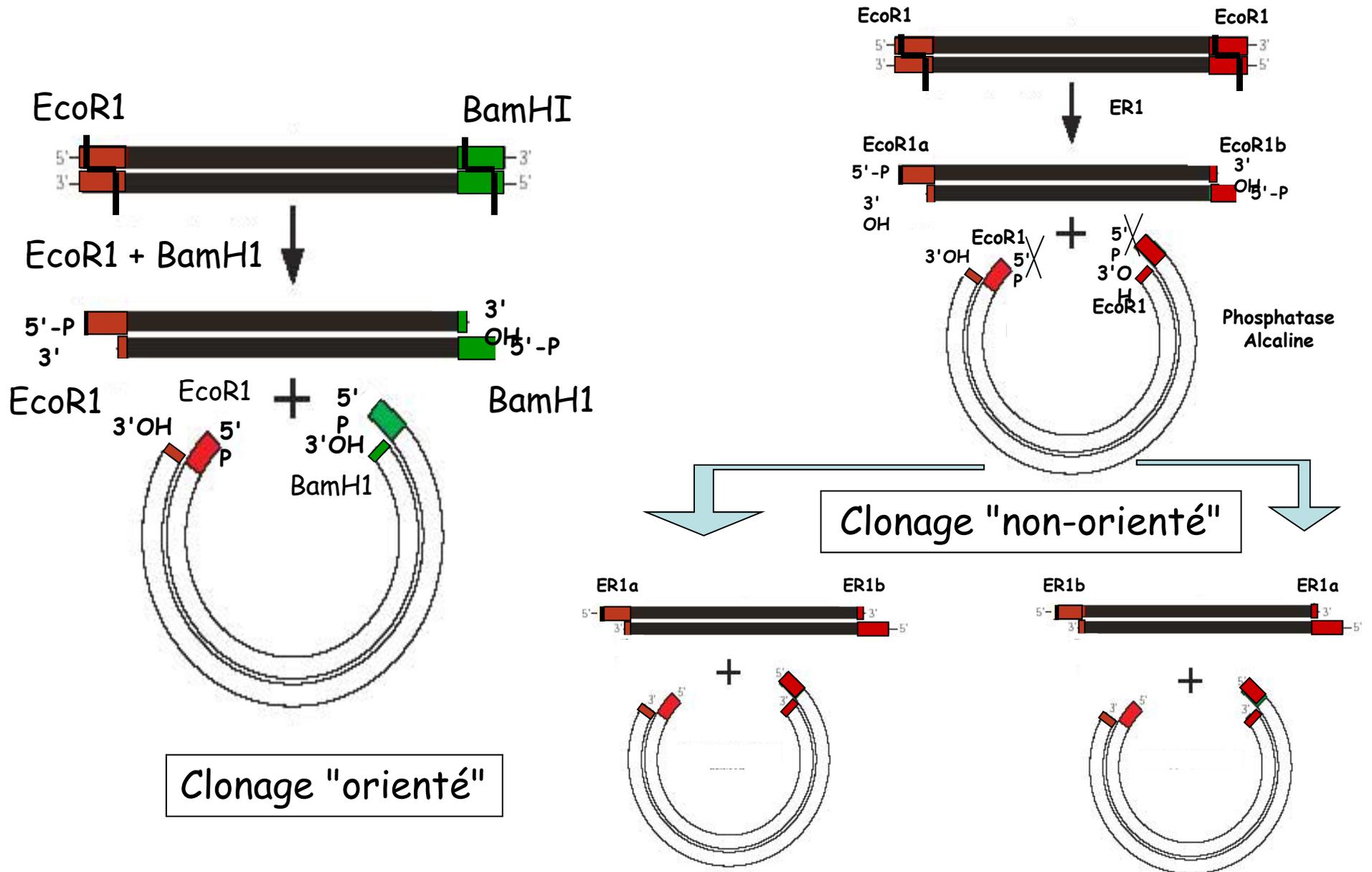


 Pas de distinction entre recombinants et non recombinants

# Pour récapituler



# 3/ clonage orienté et clonage non orienté

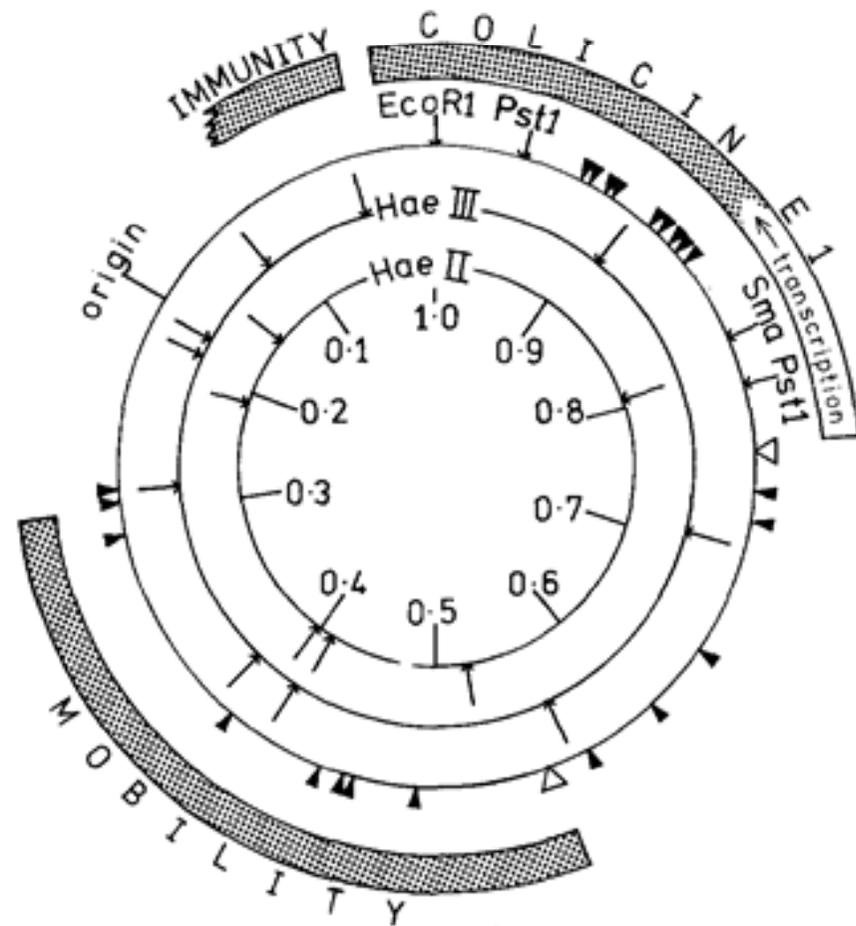


## 4/ Les différents vecteurs

### A – Les plasmides

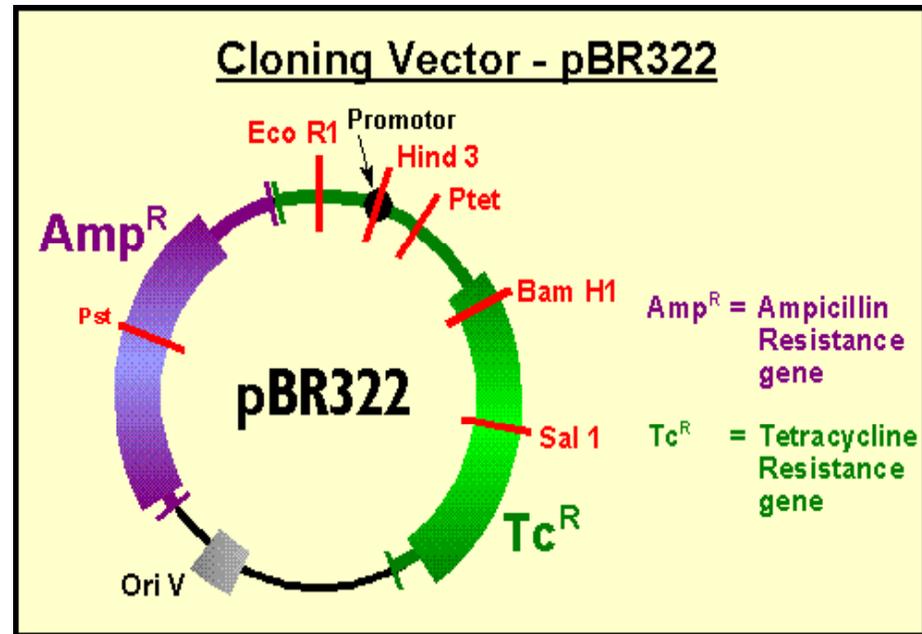
#### a - plasmides de 1<sup>ère</sup> génération : ColE1 (1977)

- plasmide circulaire 9kb
- 10-30 copies /cellule
- production de colicine



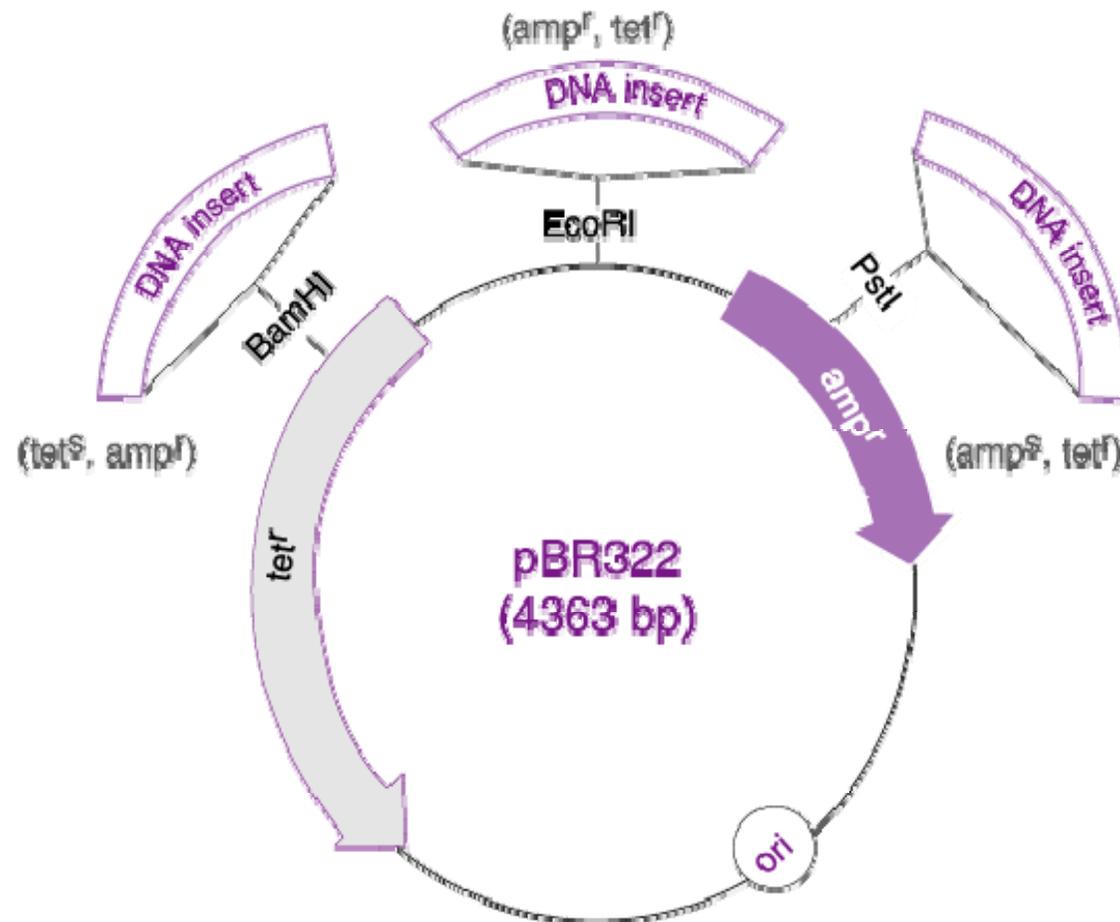
## b - plasmides de 2<sup>ème</sup> génération : pBR322

- Taille : 4363 pb
- 2 gènes de résistance
- 20 sites uniques (11 dans les gènes de résistance)



↓

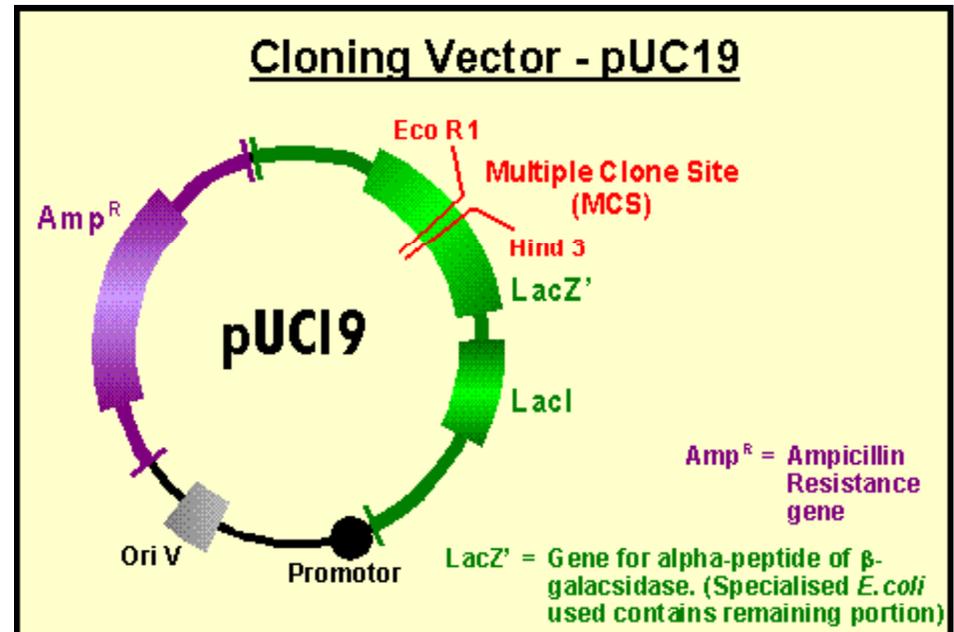
**Crible négatif:**  
Double résistance aux antibiotiques



Avec ce type de plasmide : clonage à différents sites du vecteur

## c - plasmides de 3<sup>ème</sup> génération : la famille pUC

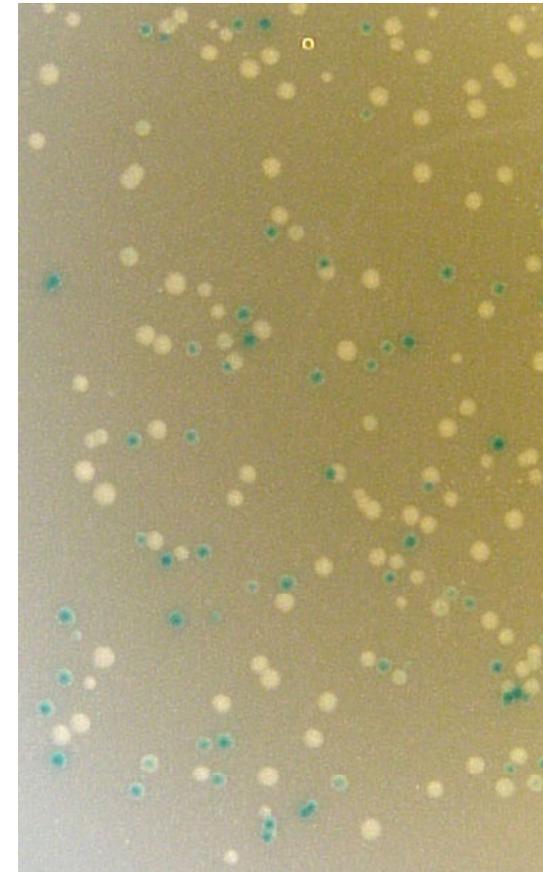
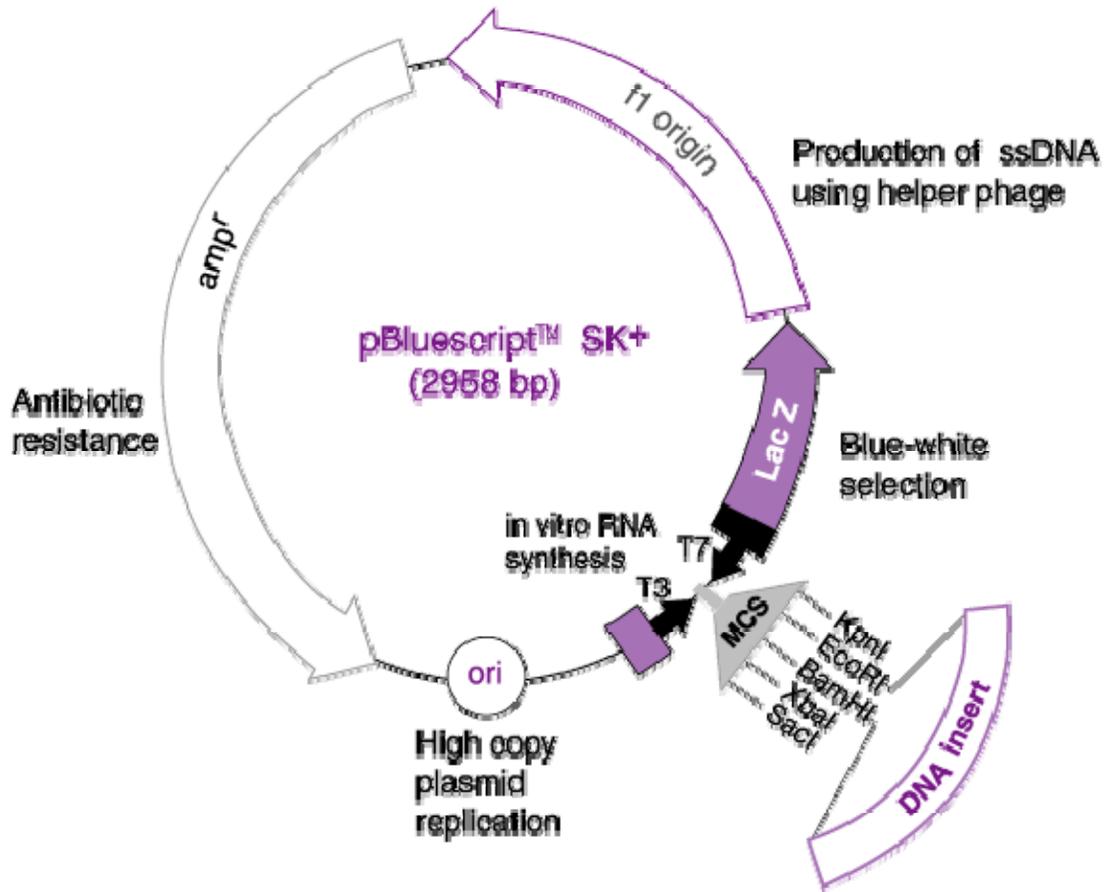
- taille ~ 2600 pb
- 1 polylinker
- une partie du gène lacZ



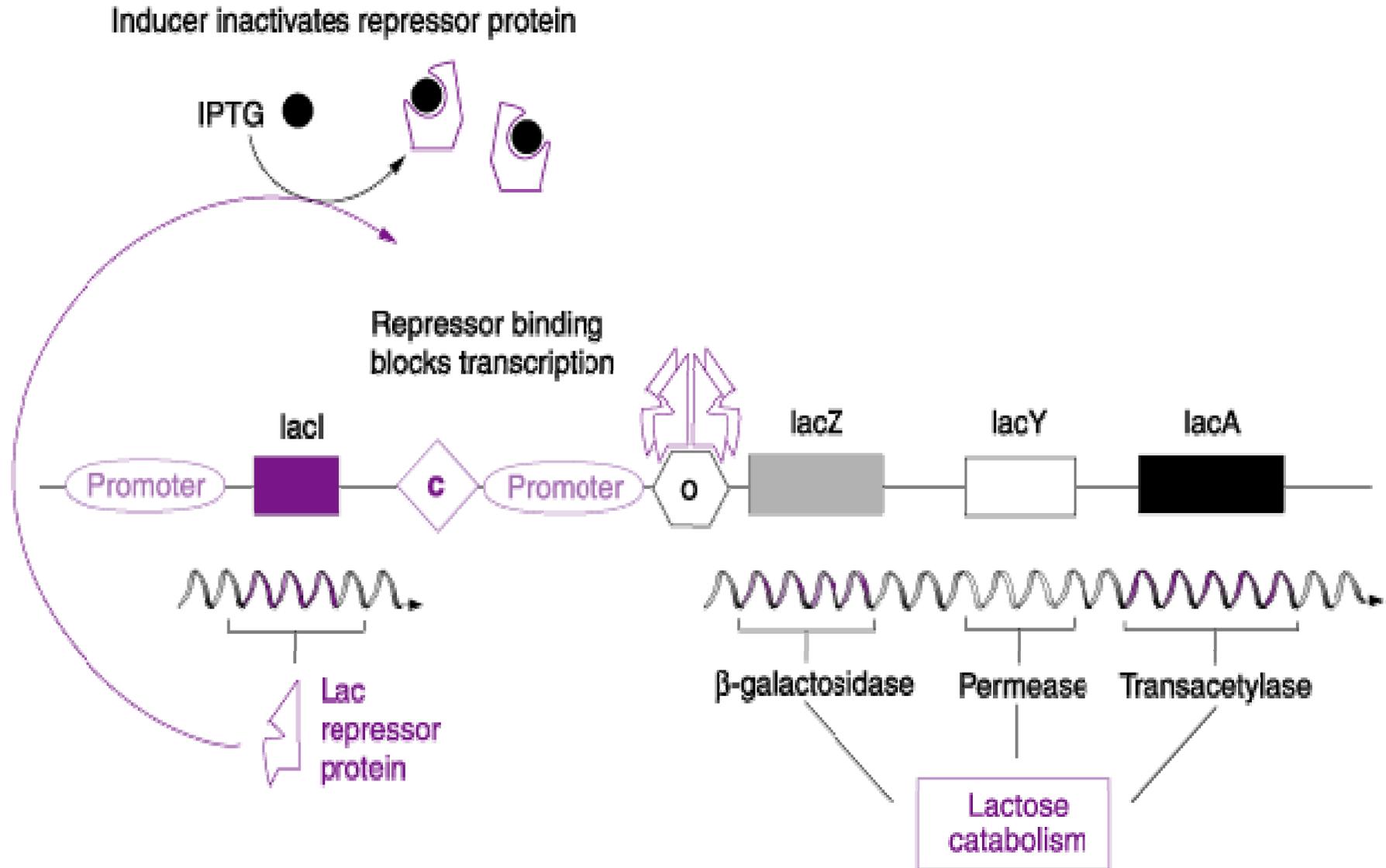
↓

**Crible positif:**  
 $\alpha$ -complémentation

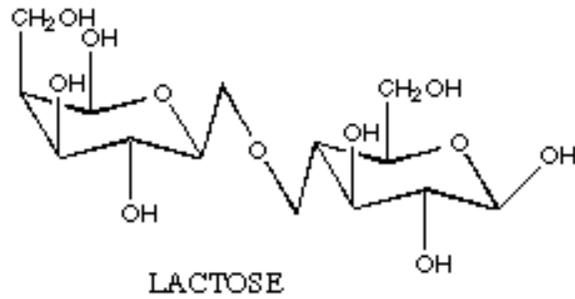
# Le crible blanc/bleu des clones recombinants



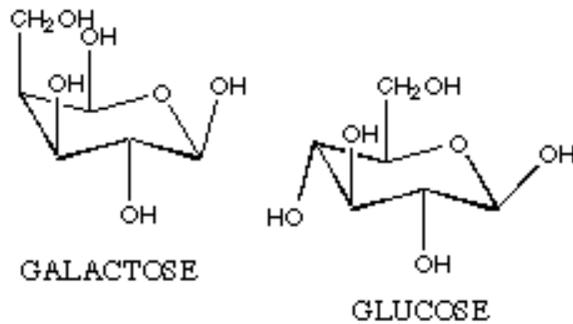
# L' OPERON LACTOSE



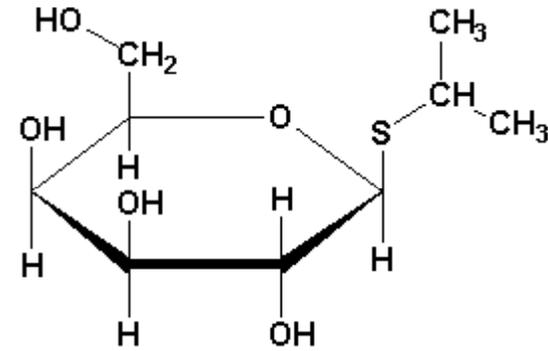
## L'activité de la b-galactosidase



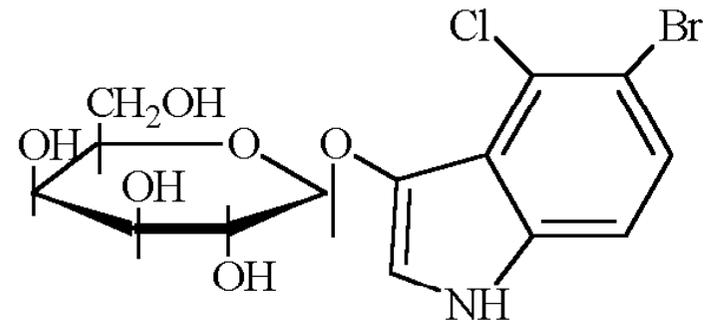
beta-GALACTOSIDASE



## L'IPTG



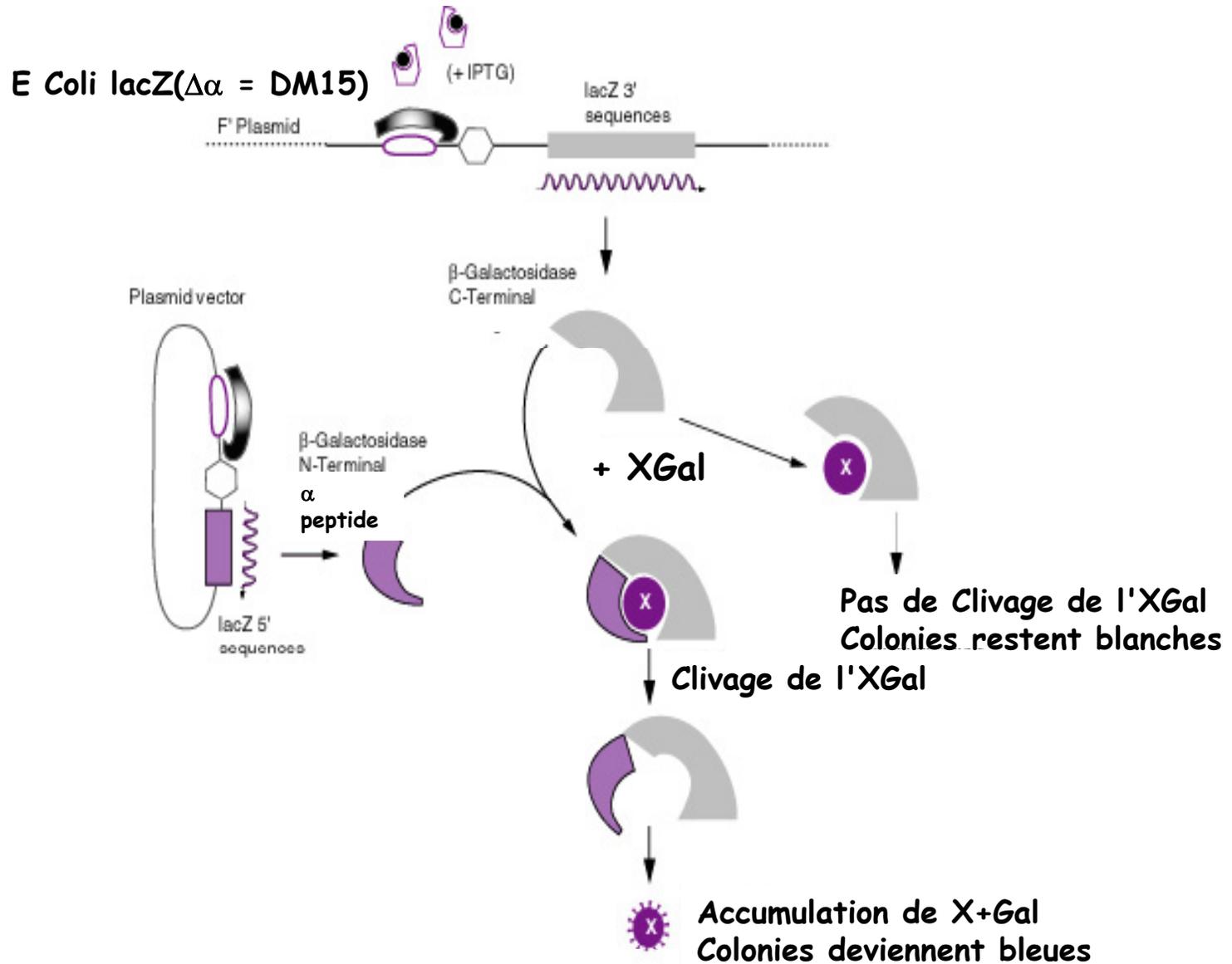
Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)



X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b -galactopyranoside

# Crible positif : $\alpha$ - complémentation

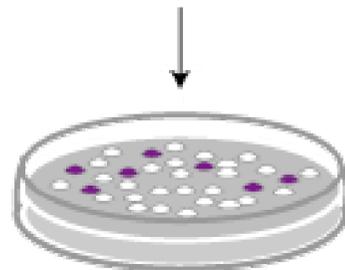
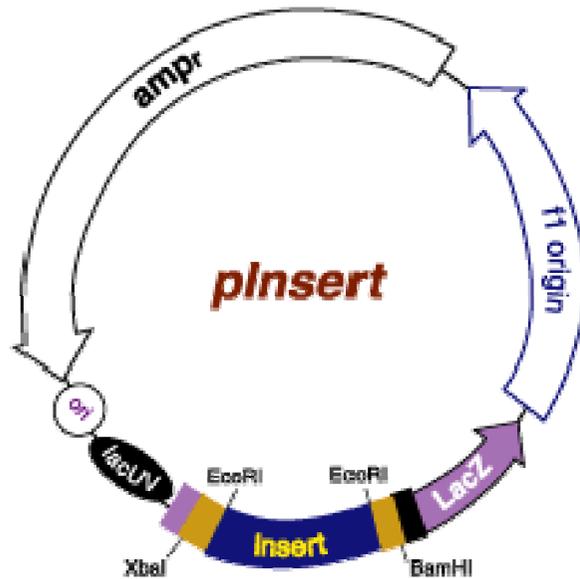


Ullman A., Jacob F. et Monod J. (1967) Characterisation by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. M. B. 24, 339-343.



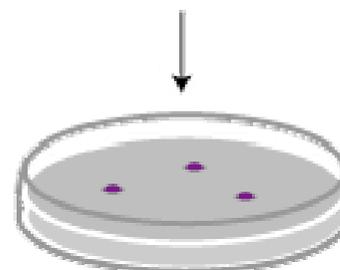
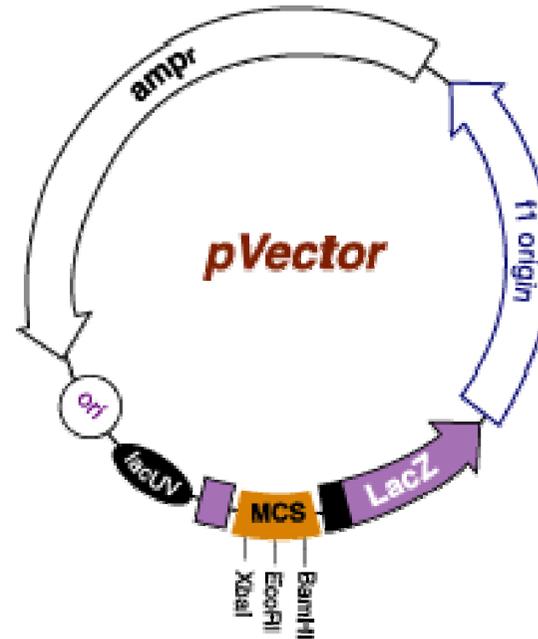
# Le contrôle de ligation

vecteur + insert  
+ligase



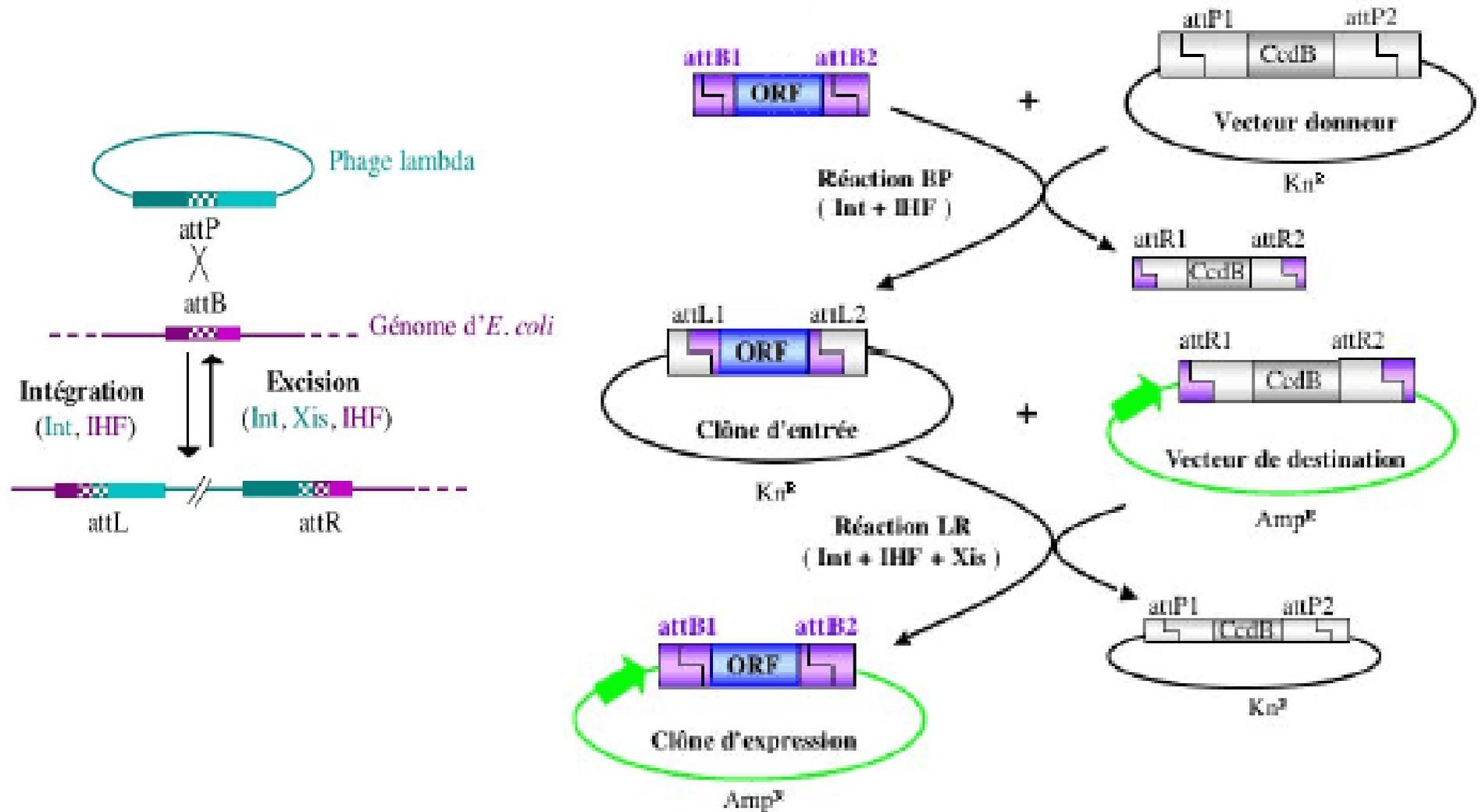
Amp+X-Gal plate

vecteur + insert  
- ligase



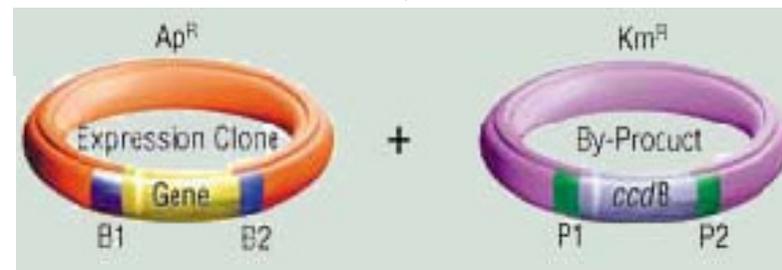
Amp+X-Gal plate

# d – Plasmides de 4<sup>ème</sup> génération : système Gateway®



➔ Transformation

# Application : passage d'un vecteur à un autre

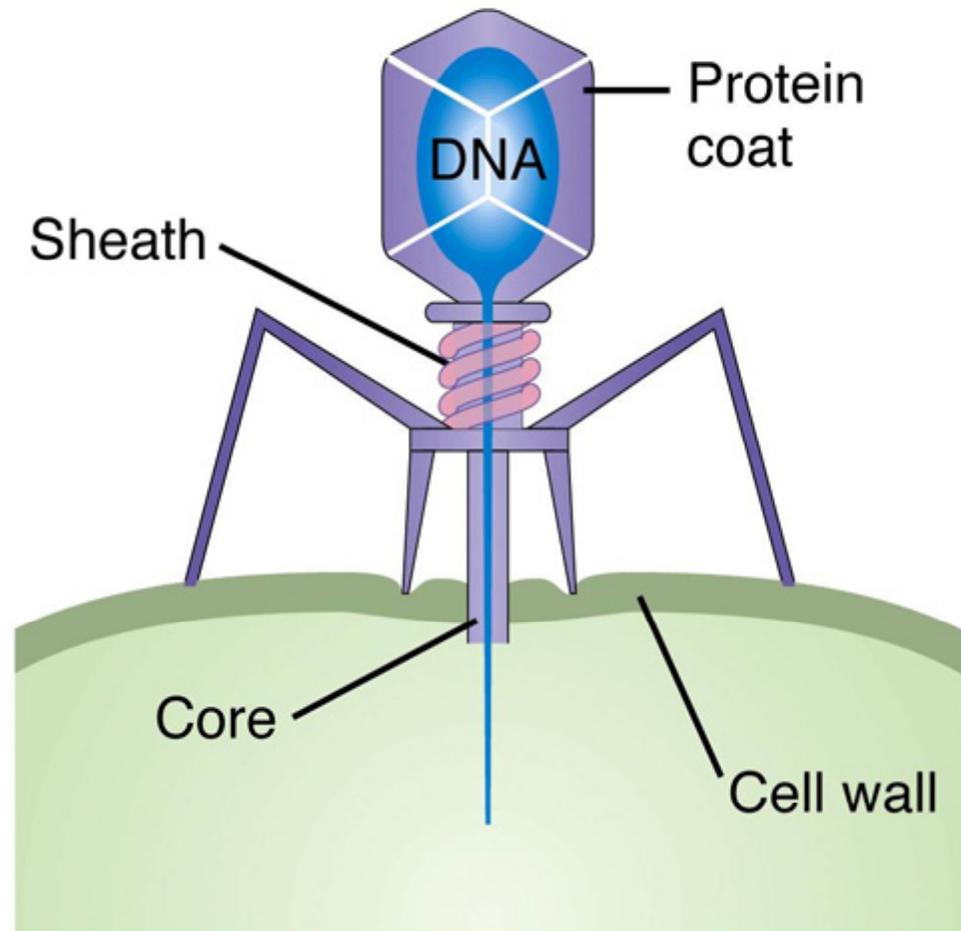


## 4/ Les différents vecteurs

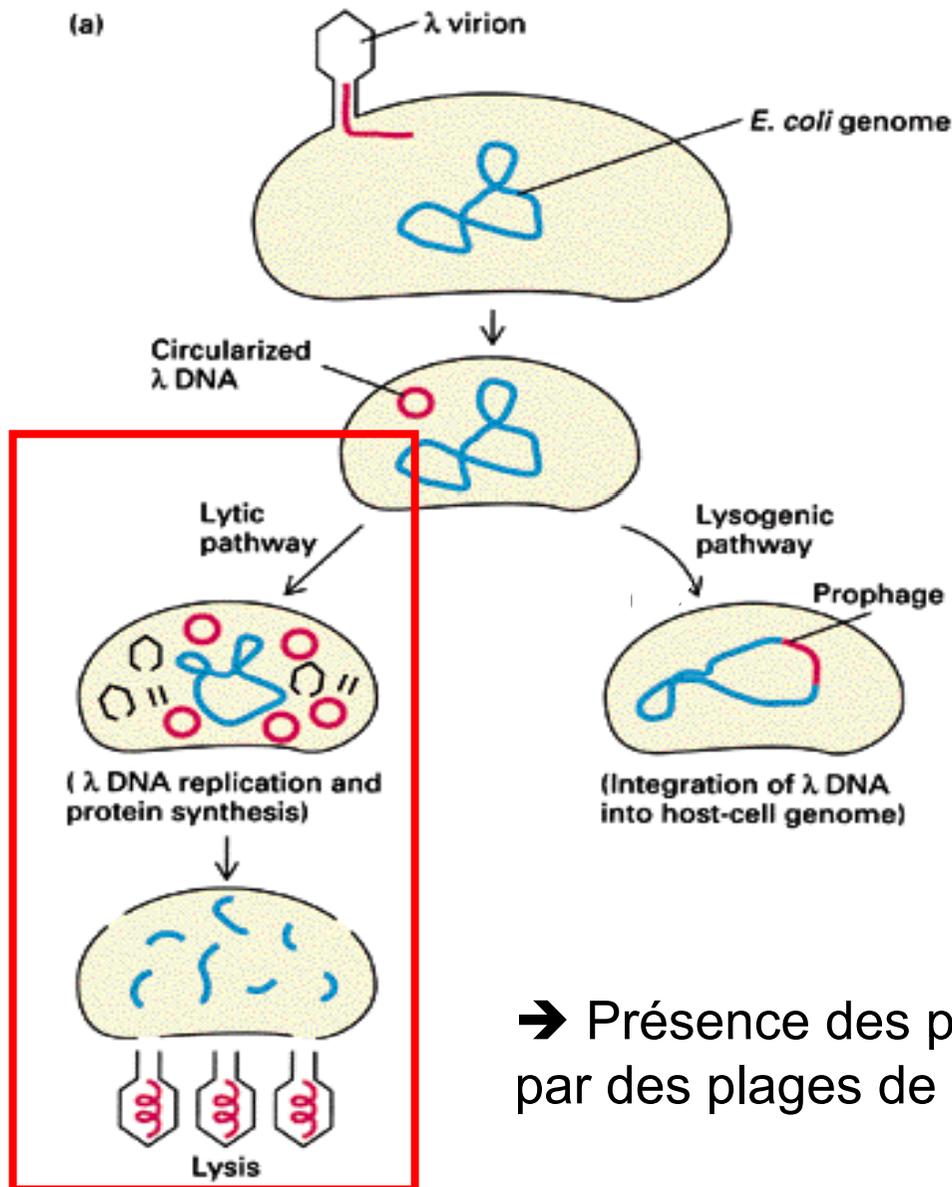
### B – Les bactériophages

**Définition** : virus de bactéries munis d'un système de pénétration se multipliant de façon autonome dans la cellule hôte.

- Très bon rendement d'infection
- Taille de l'ADN à insérer >> aux plasmides
- Maniement + complexe

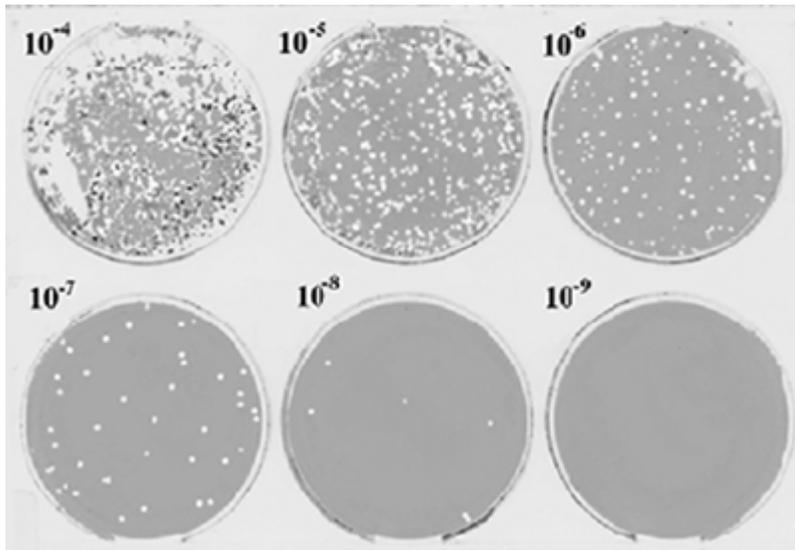
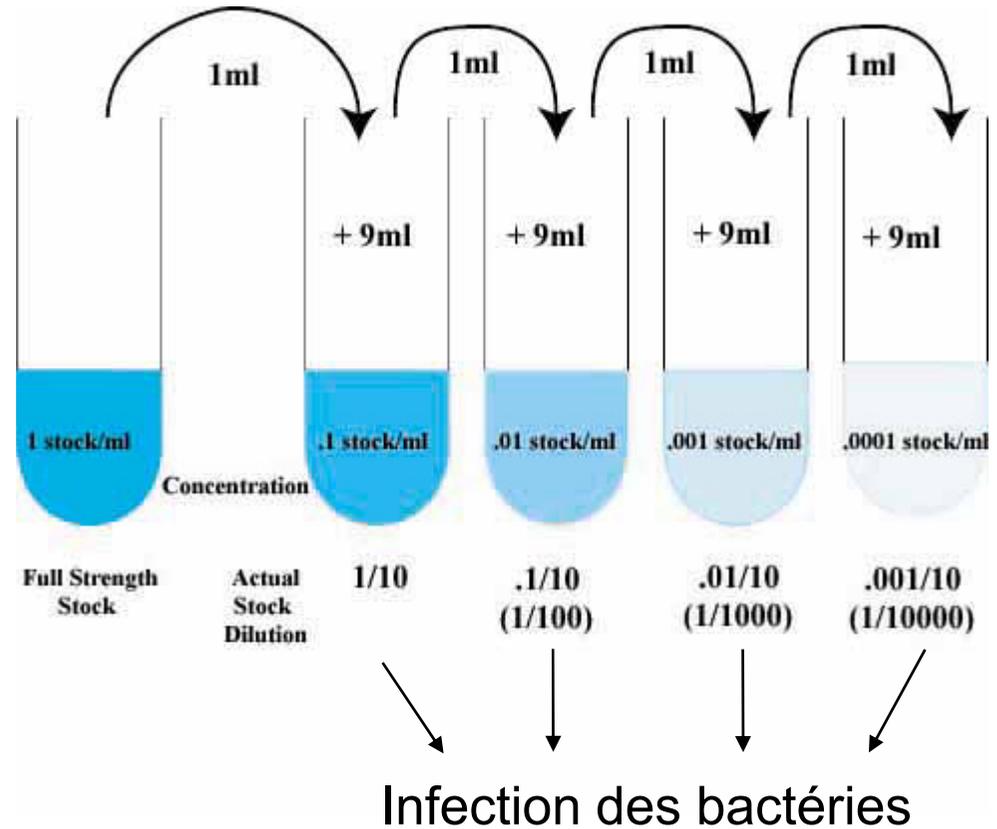


# Cycle lytique / lysogénique (phage $\lambda$ )



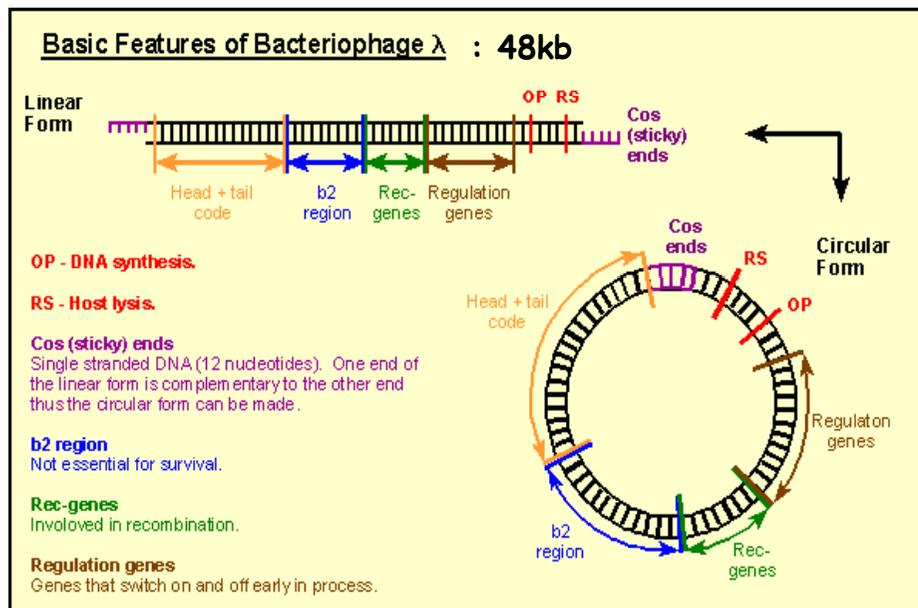
➔ Présence des phages objectivée par des plages de lyse

→ Titration des phages

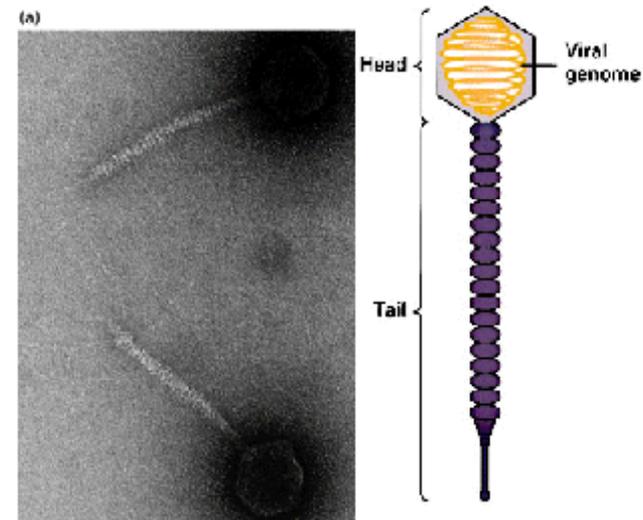


→ Titre =  
plages de lyses x dilution

# a – Le bactériophage $\lambda$

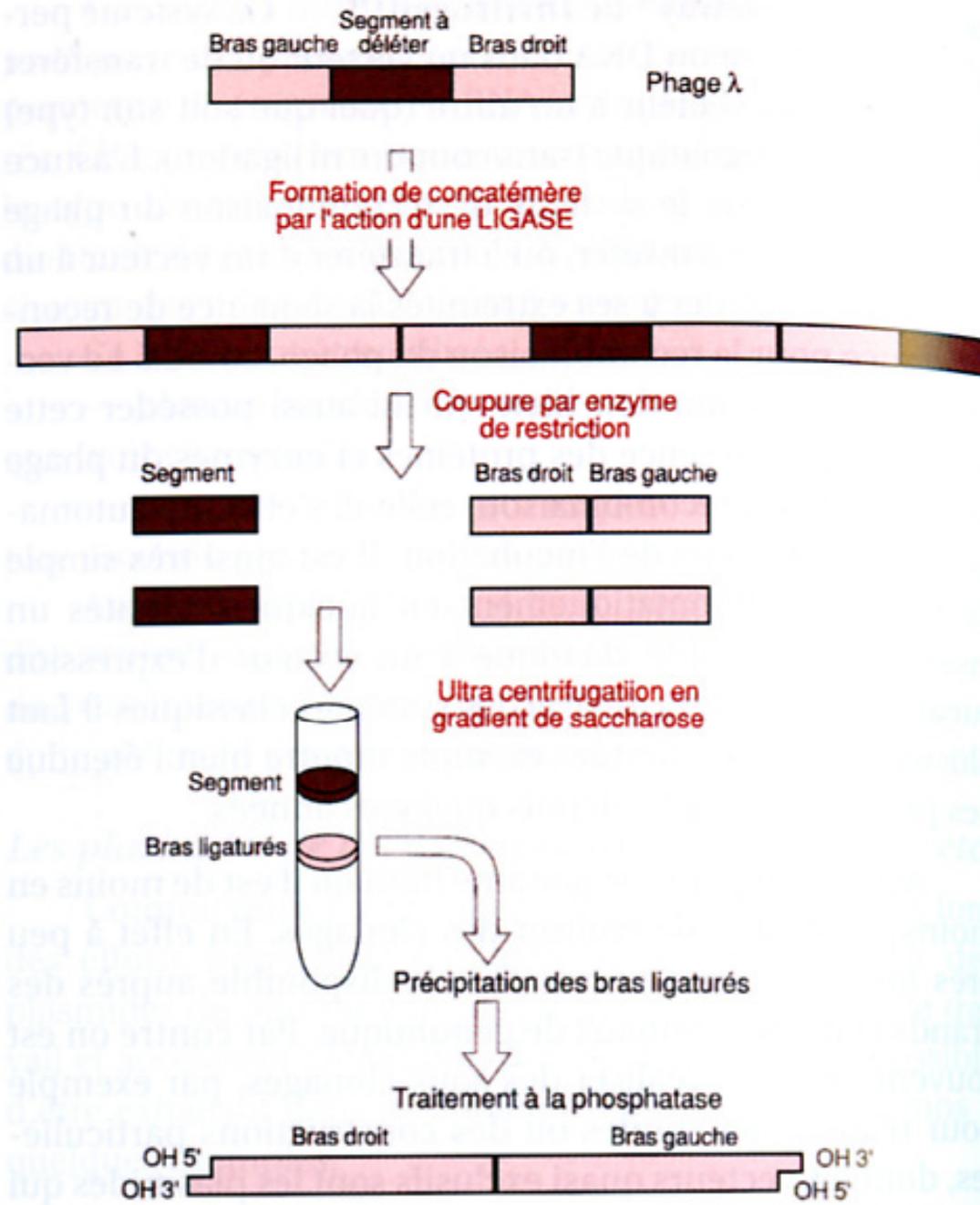


## Bacteriophage Cloning Vector

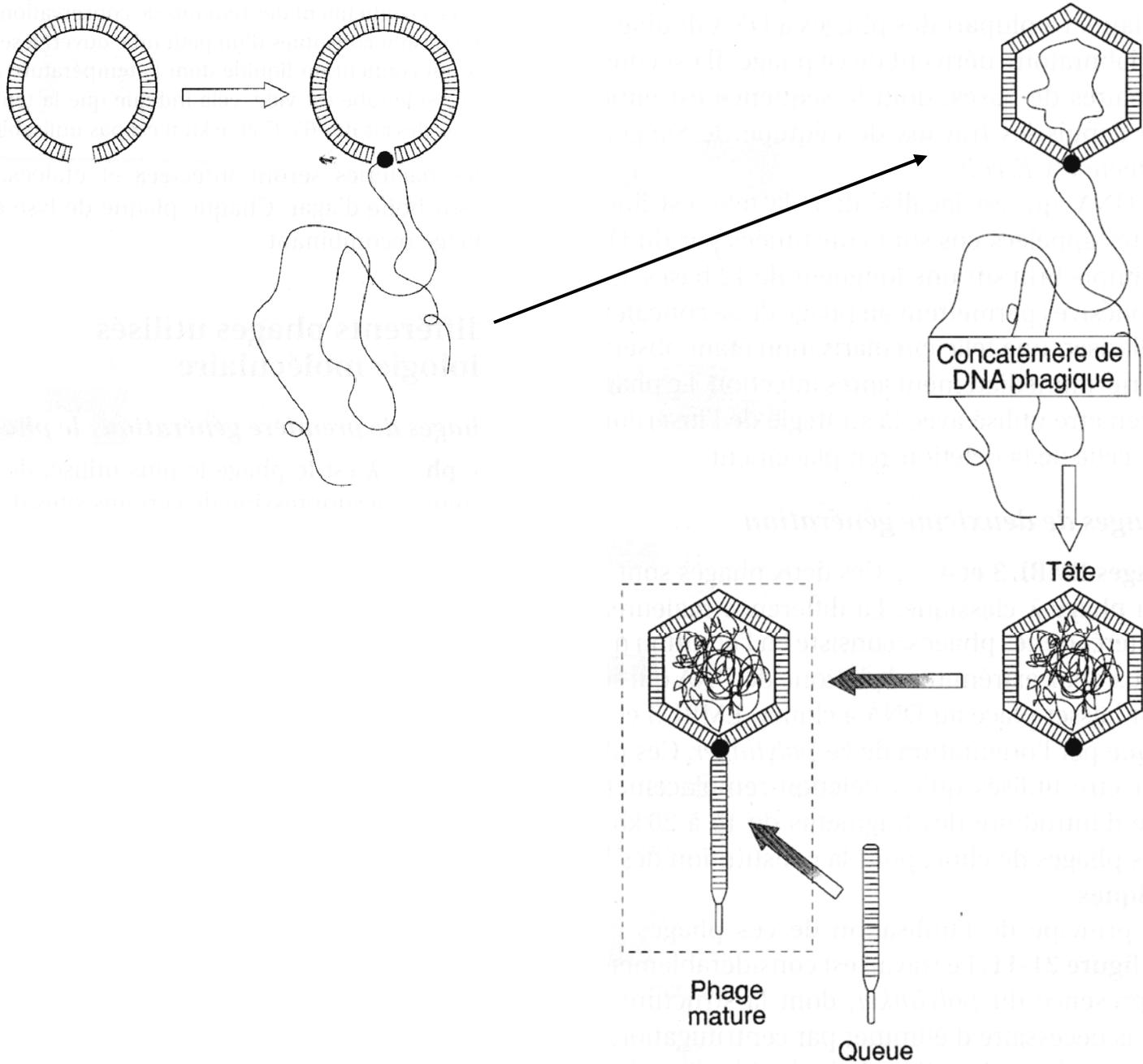


**APPLICATION Principale : Banques d'ADNg**

# \* Le clonage par délétion remplacement



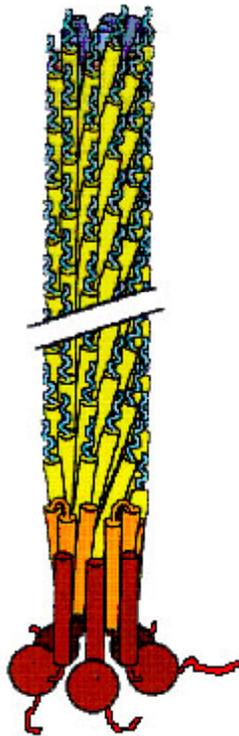
# \* L'encapsidation in-vitro



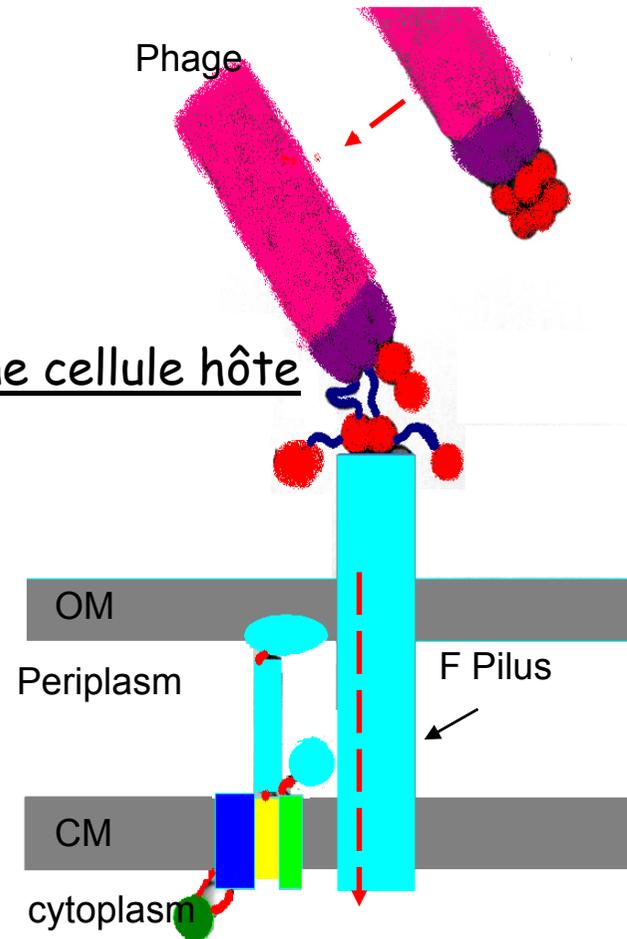
# b - phage M13

Génome : 6.4kb, ADN simple brin

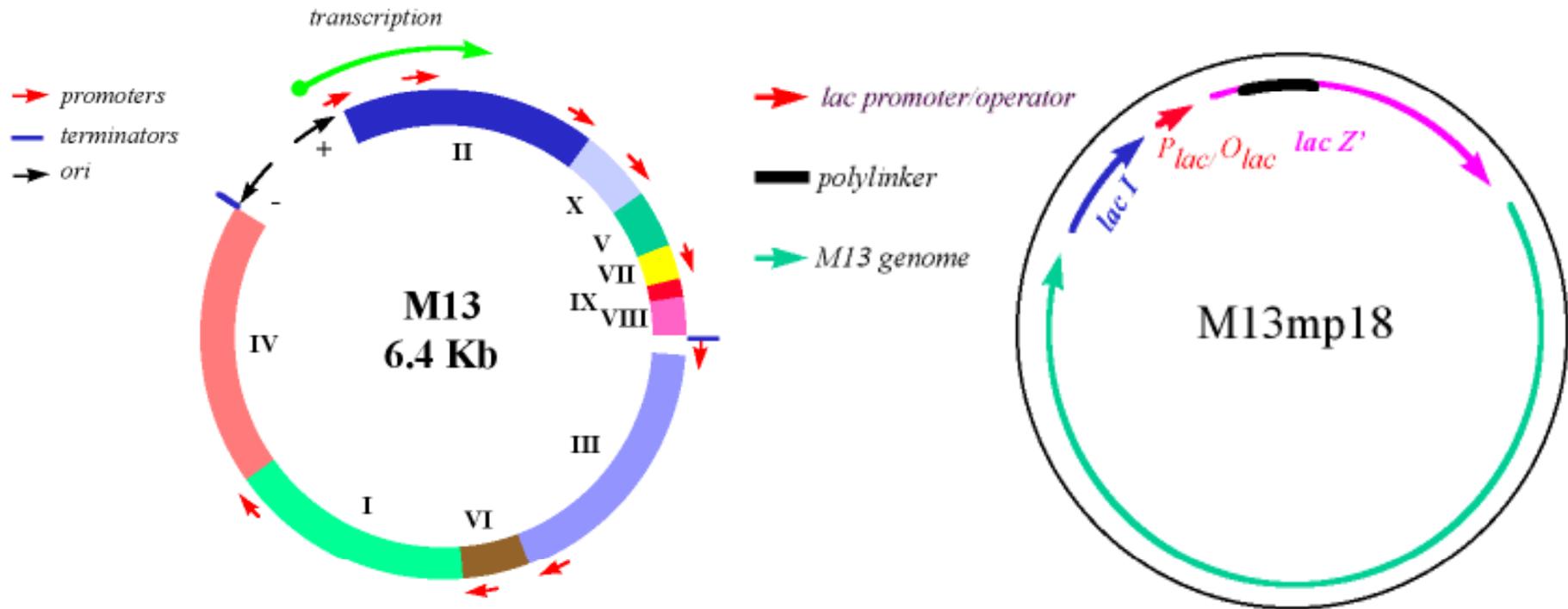
Structure



Infection d'une cellule hôte



APPLICATION Principale : Séquençage, mutagénèse,



mp18

atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gta ccc ggg gat cct cta gag tcg acc tgc agg cat gca agc ttg gca ctg gcc

*EcoRI*      *KpnI*      *BamHI*      *SalI*      *SphI*

*SacI*      *SmaI*      *XbaI*      *PstI*      *HindIII*

mp19

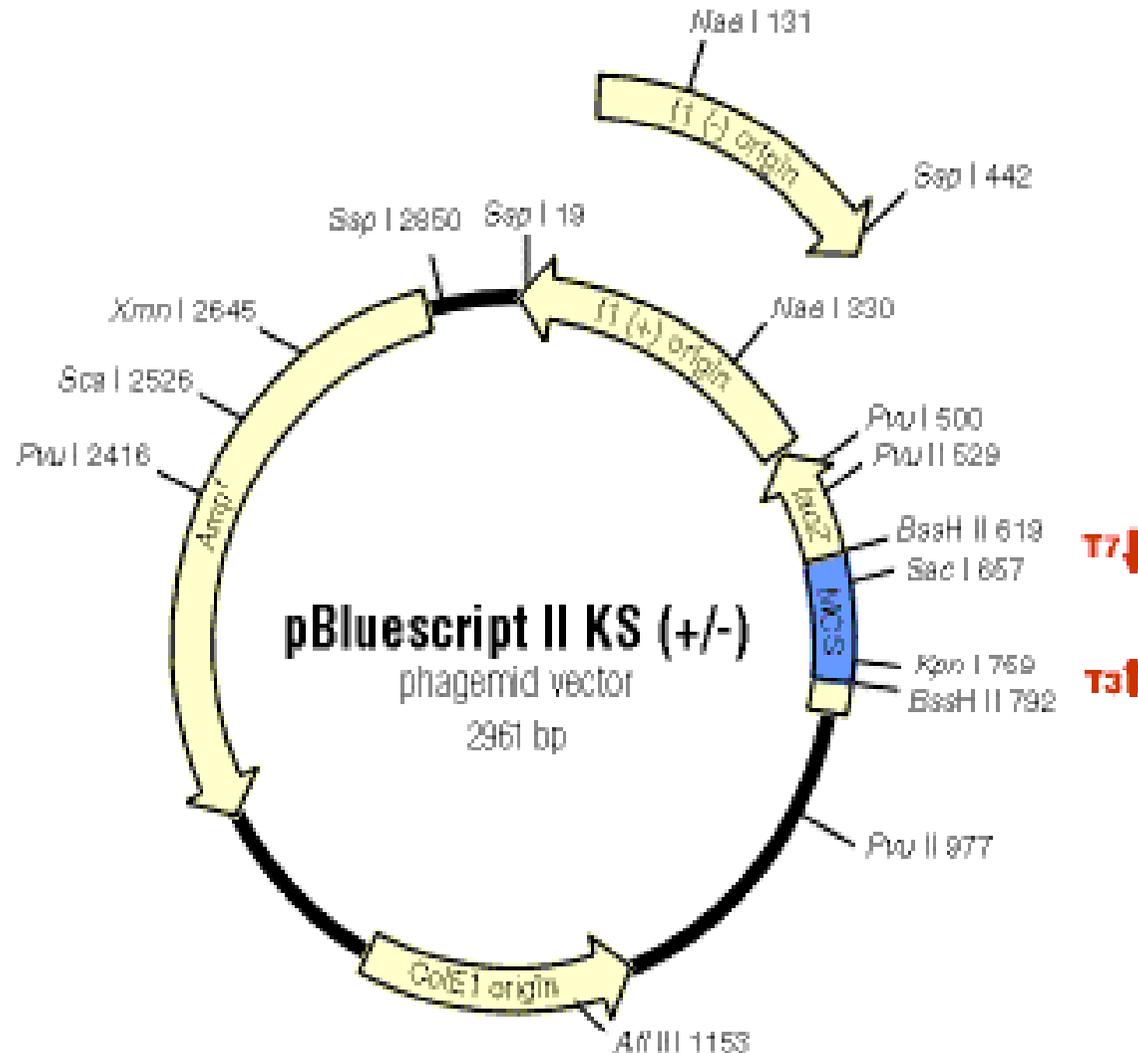
atg acc atg att acg cca agc ttg cat gcc tgc agg tcg act cta gag gat ccc cgg gta ccg agc tcg aat tca ctg gcc

*SphI*      *SalI*      *BamHI*      *KpnI*      *EcoRI*

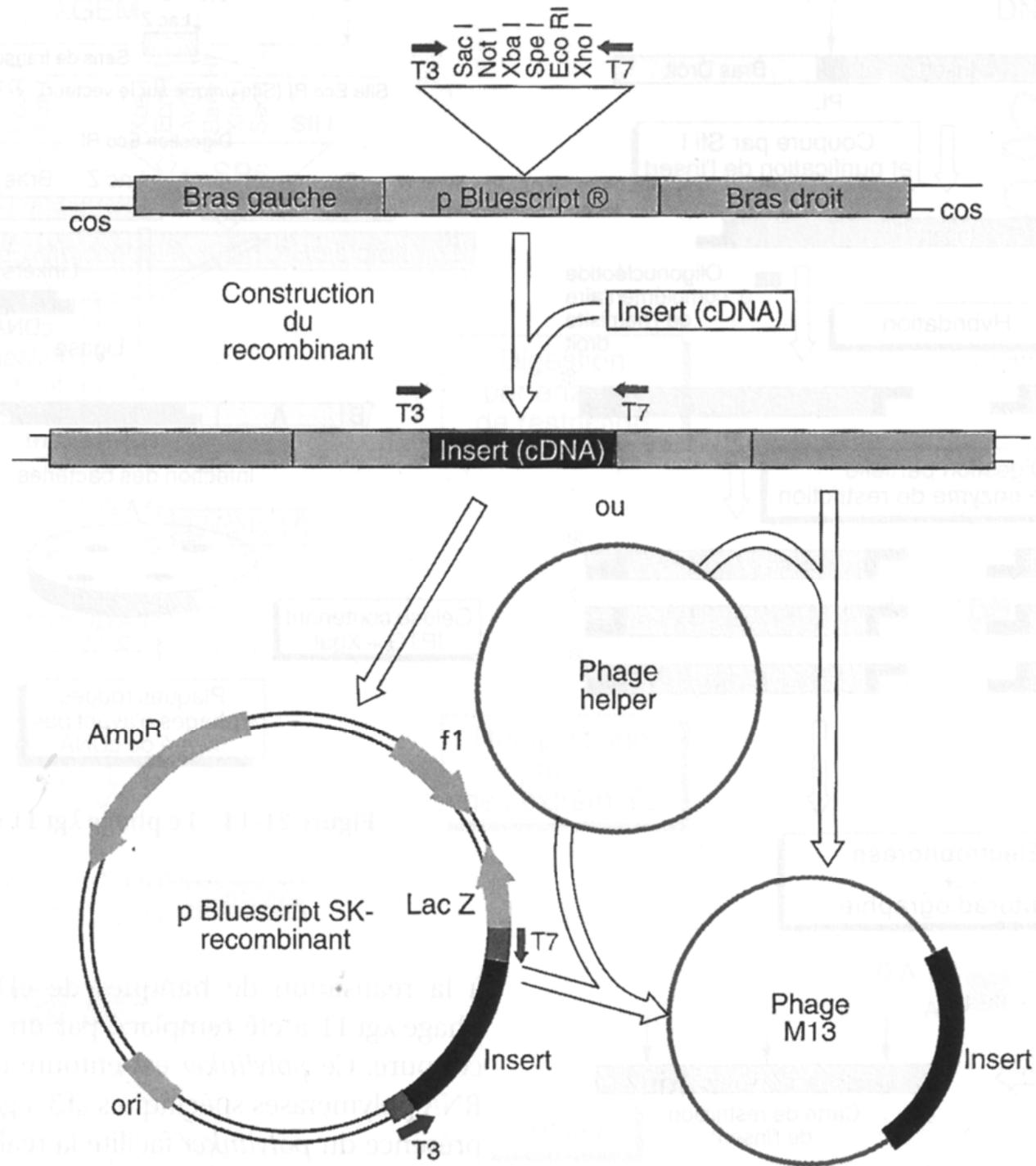
*HindIII*      *PstI*      *XbaI*      *SmaI*      *SacI*

## 4/ Les différents vecteurs

### c - Systèmes hybrides : Les Phagemides

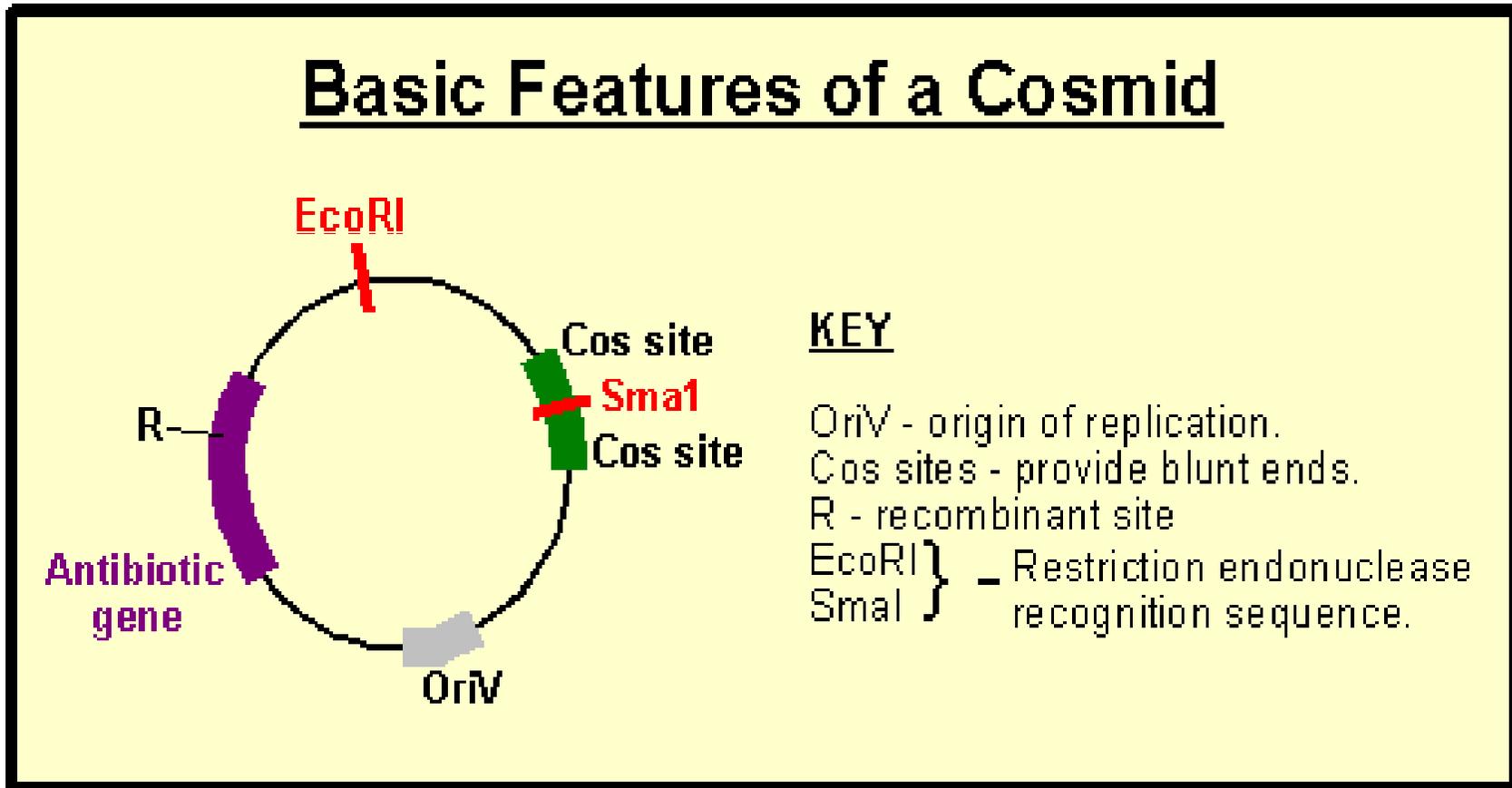


**APPLICATION Principale : clonage d'ADNc**

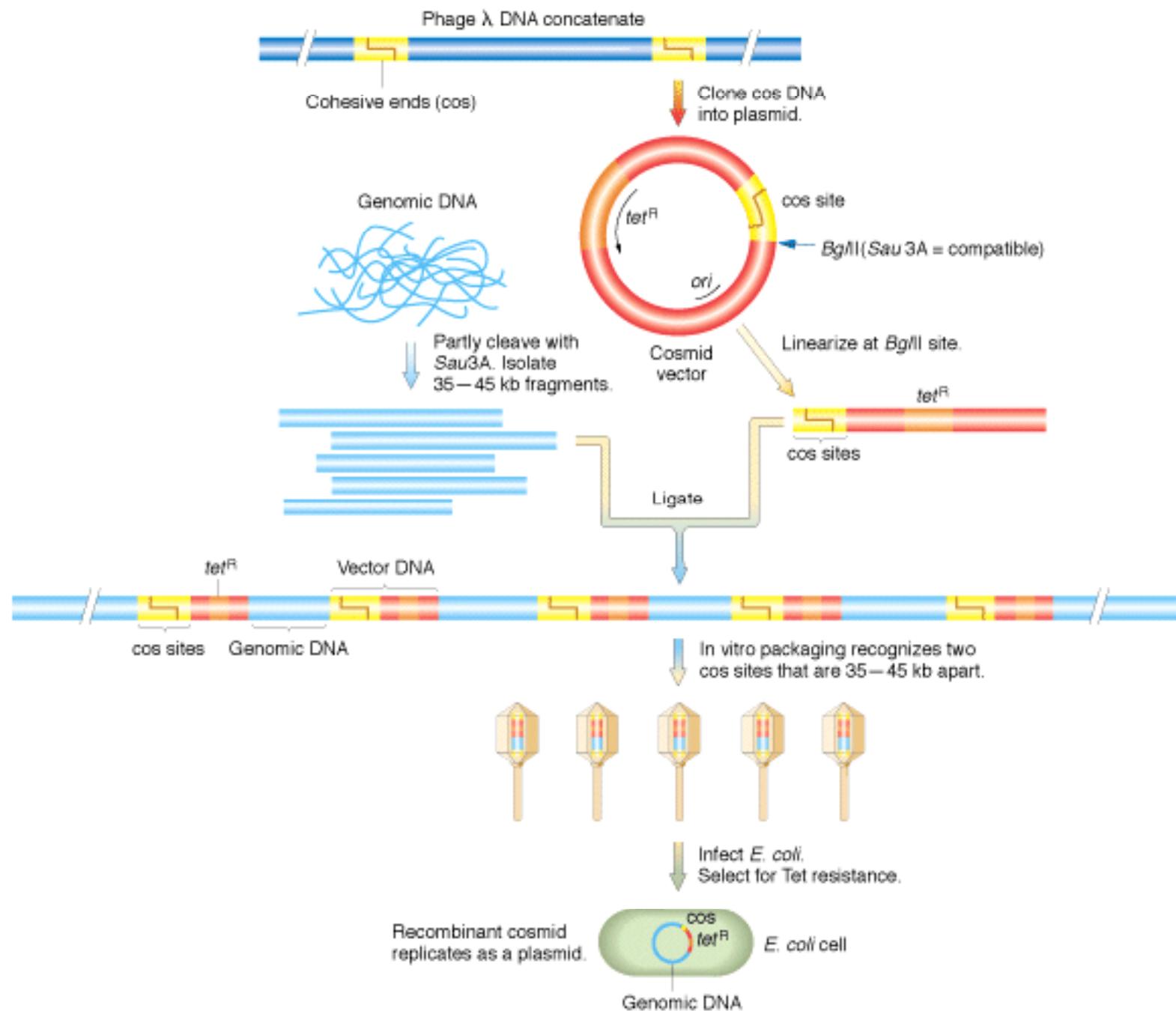


## 4/ Les différents vecteurs

### d - Systèmes hybrides : Les cosmides



**APPLICATION Principale : Banques d'ADN génomiques**



## 4/ Les différents vecteurs

### C – Les vecteurs eucaryotes

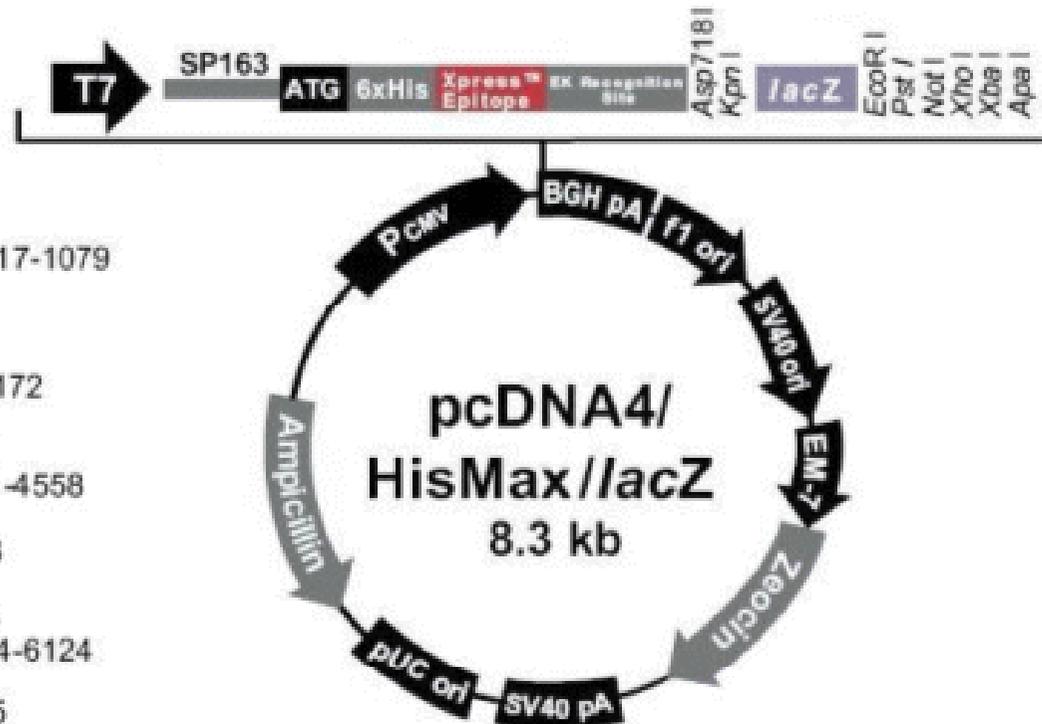
Ils sont constitués :

- d'un promoteur (SV40, CMV)
- d'un site de polyadénylation (SV40)
- Facultatif : un gène de sélection eucaryote
- Facultatif : une origine de réplication eucaryote
- Éléments nécessaires à la sélection des transformants chez les bactéries

→ la construction doit être transfectée dans des cellules en culture

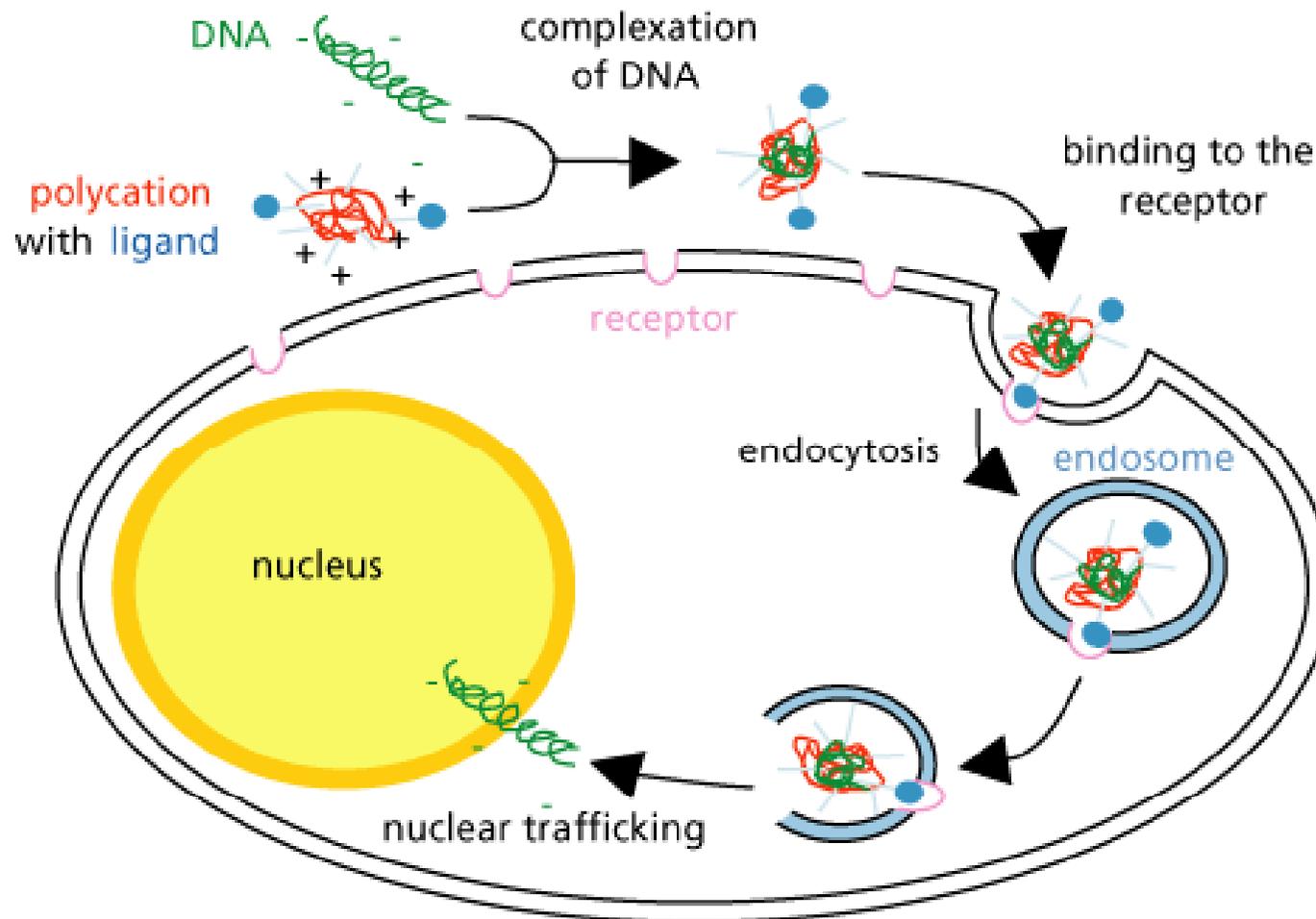
**Comments for pcDNA4/HisMax/lacZ:  
8321 nucleotides**

CMV promoter: bases 232-819  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 QBI SP163 translational enhancer: bases 917-1079  
 ATG initiation codon: bases 1080-1082  
 Polyhistidine tag: bases 1092-1109  
 Xpress™ epitope: bases 1149-1172  
 Enterokinase recognition site: bases 1158-1172  
 LacZ ORF: bases 1197-4247  
 BGH reverse priming site: bases 4328-4345  
 BGH polyadenylation sequence: bases 4331-4558  
 f1 origin: bases 4604-5032  
 SV40 promoter and origin: bases 5059-5368  
 EM-7 promoter: bases 5416-5471  
 Zeocin™ resistance gene: bases 5490-5864  
 SV40 polyadenylation sequence: bases 5994-6124  
 pUC origin: bases 6507-7180  
 Ampicillin resistance gene: bases 7325-8185



Transfection : pénétration à l'aide d'agents cationiques, lipidiques ou par électrotransfert d'acide nucléique dans une cellule eucaryote

Ex : utilisation d'un polymère cationique

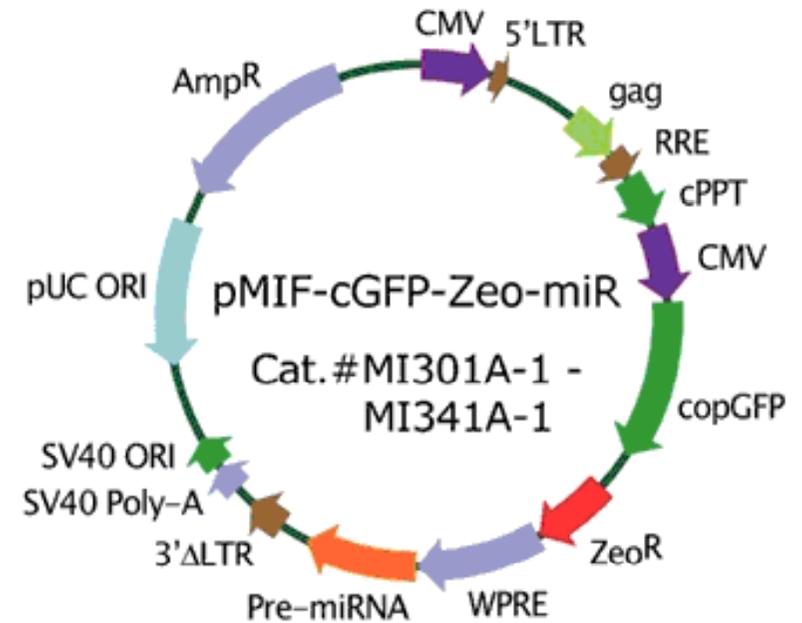
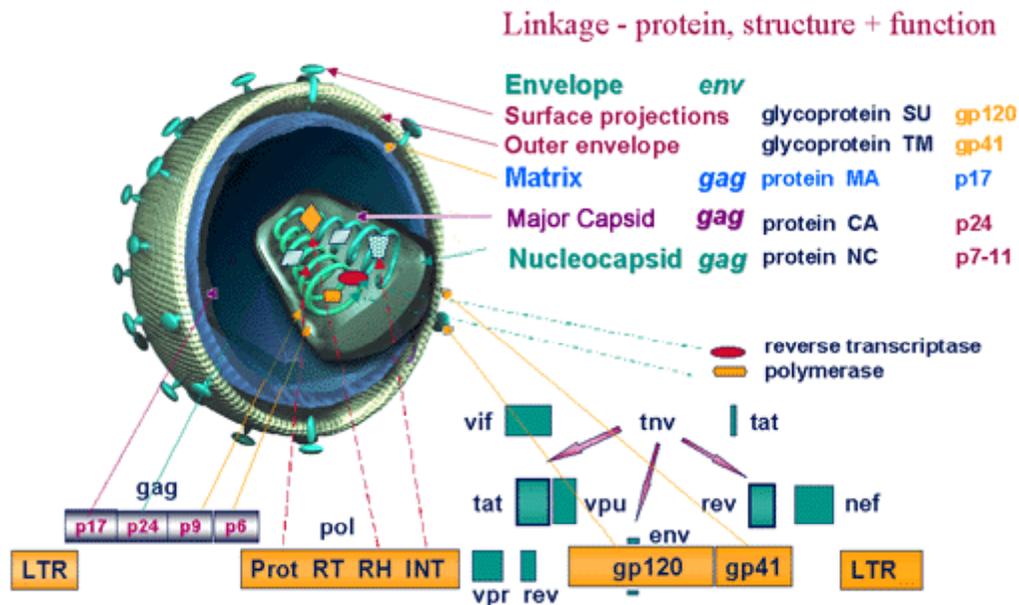


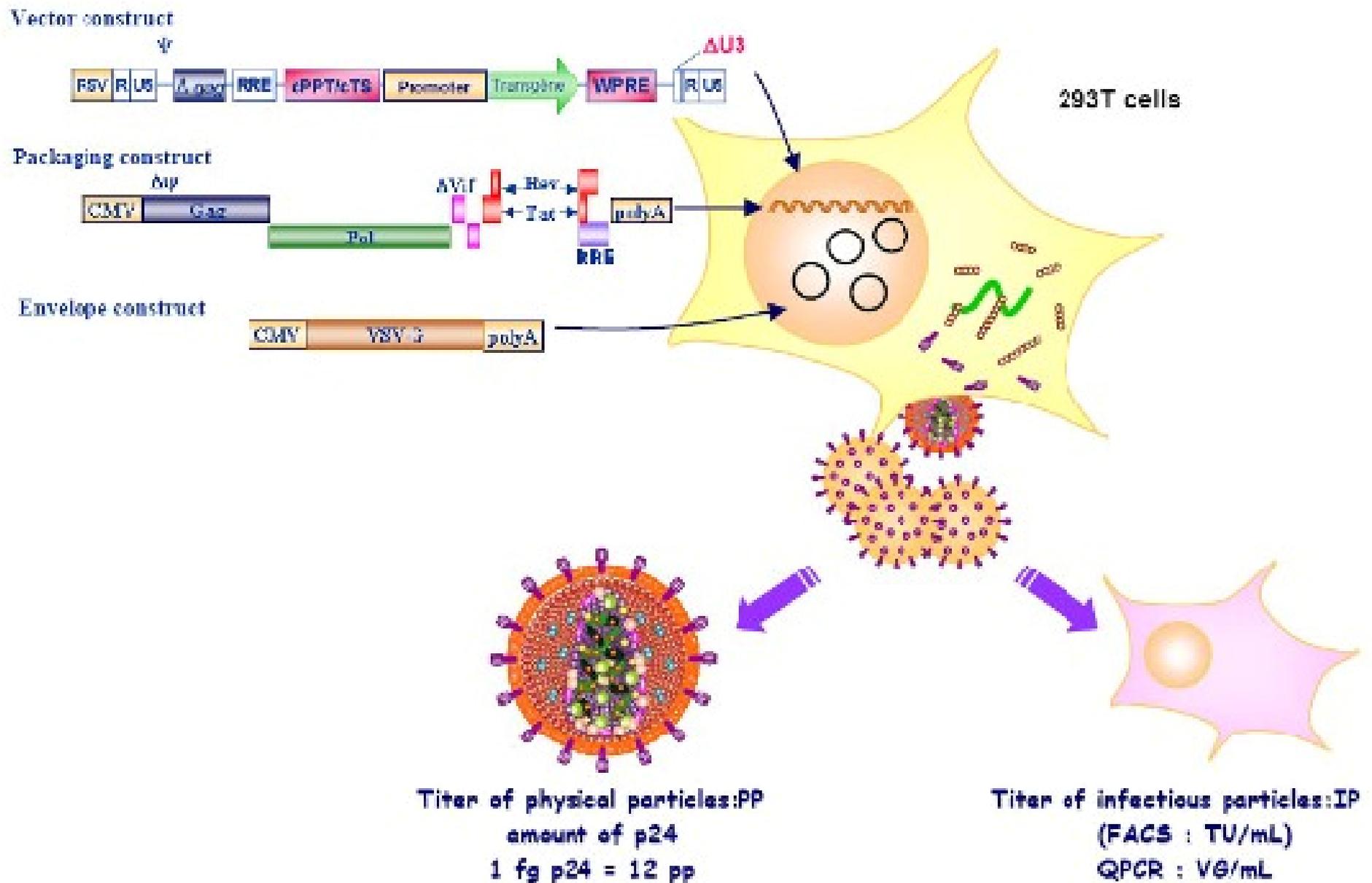
# 4/ Les différents vecteurs

## D – les vecteurs viraux

Un exemple : les lentivecteurs (lentivirus)

### Genome map of Lentivirus

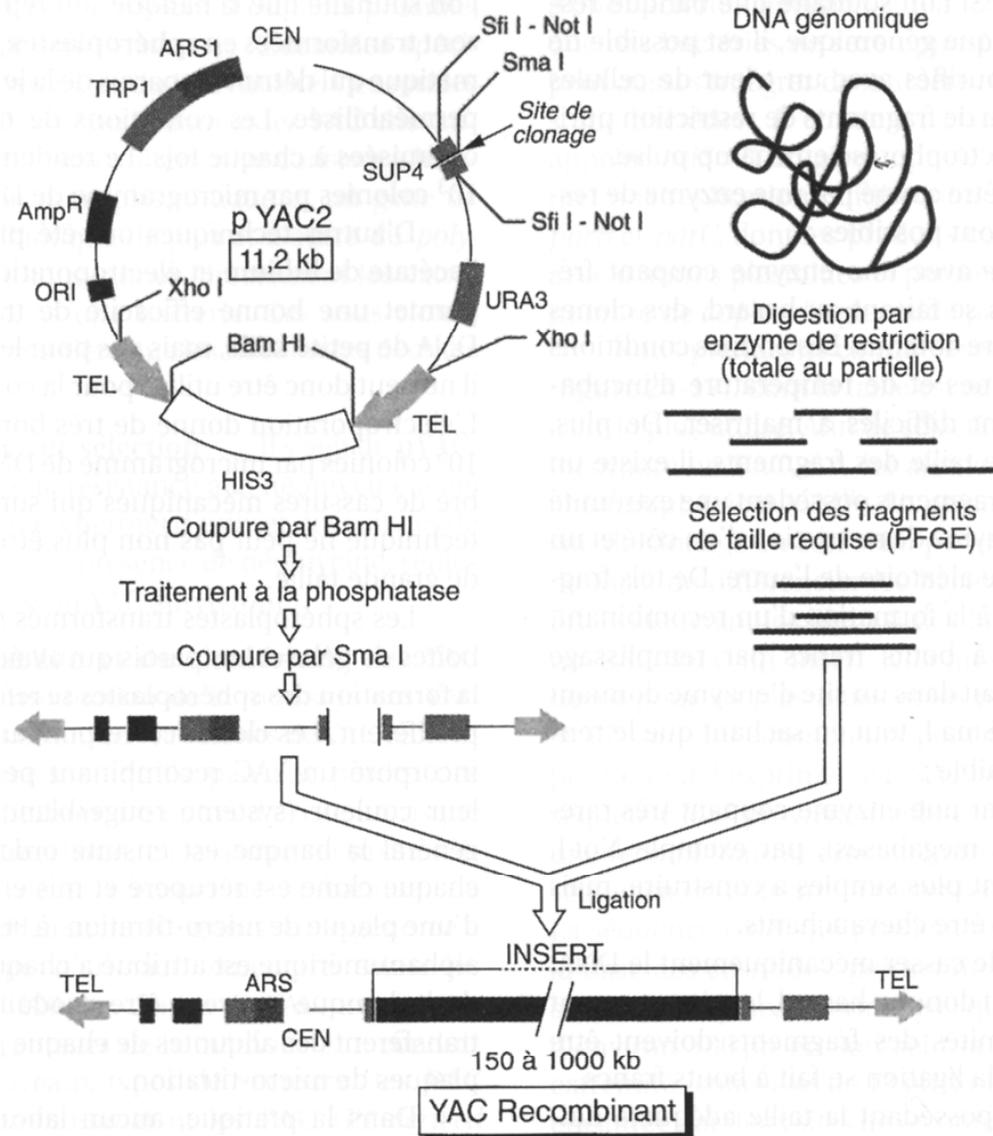




Transduction : infection in-vitro d'une cellule eucaryote par un vecteur viral.

# 5/ Les chromosomes artificiels

## a – les YACs (Yeast Artificial Chromosome)

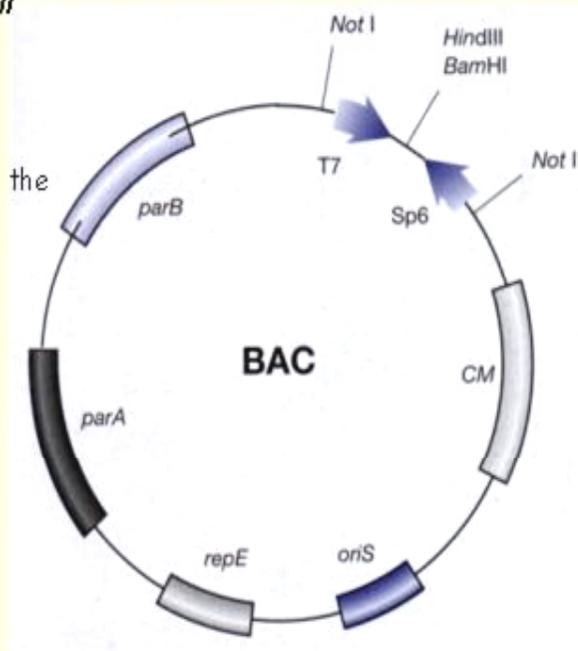


Taille des inserts 150 – 2000 kb

## 5/ Les chromosomes artificiels

### b – les BACs (Bacterial Artificial Chromosome)

- **BAC vectors are similar to standard *E. coli* plasmid vectors**
  - Contain the origin and genes encoding the ORI-binding proteins required for plasmid replication
  - derived from a naturally occurring **large** plasmid, the *F-factor*
  - Low copy number (1-2 copies per cell)
  - Low transformation efficiency overcome by electroporating recombinant DNA into *E. coli*
- **Advantages of BACs compared to YACs**
  - Stable
  - Ease of transformation
  - Speed of growth of *E. coli* host
  - Simpler to purify
  - More user-friendly



**parA, parB et repE sont des gènes requis pour la stabilité du BAC.**

- OriS est une origine de réplication
- CM : gène de résistance au chloramphenicol

Taille des inserts 130 – 150 kb