



Clonage et vecteur de clonage ou Technologie de l'ADN recombinant

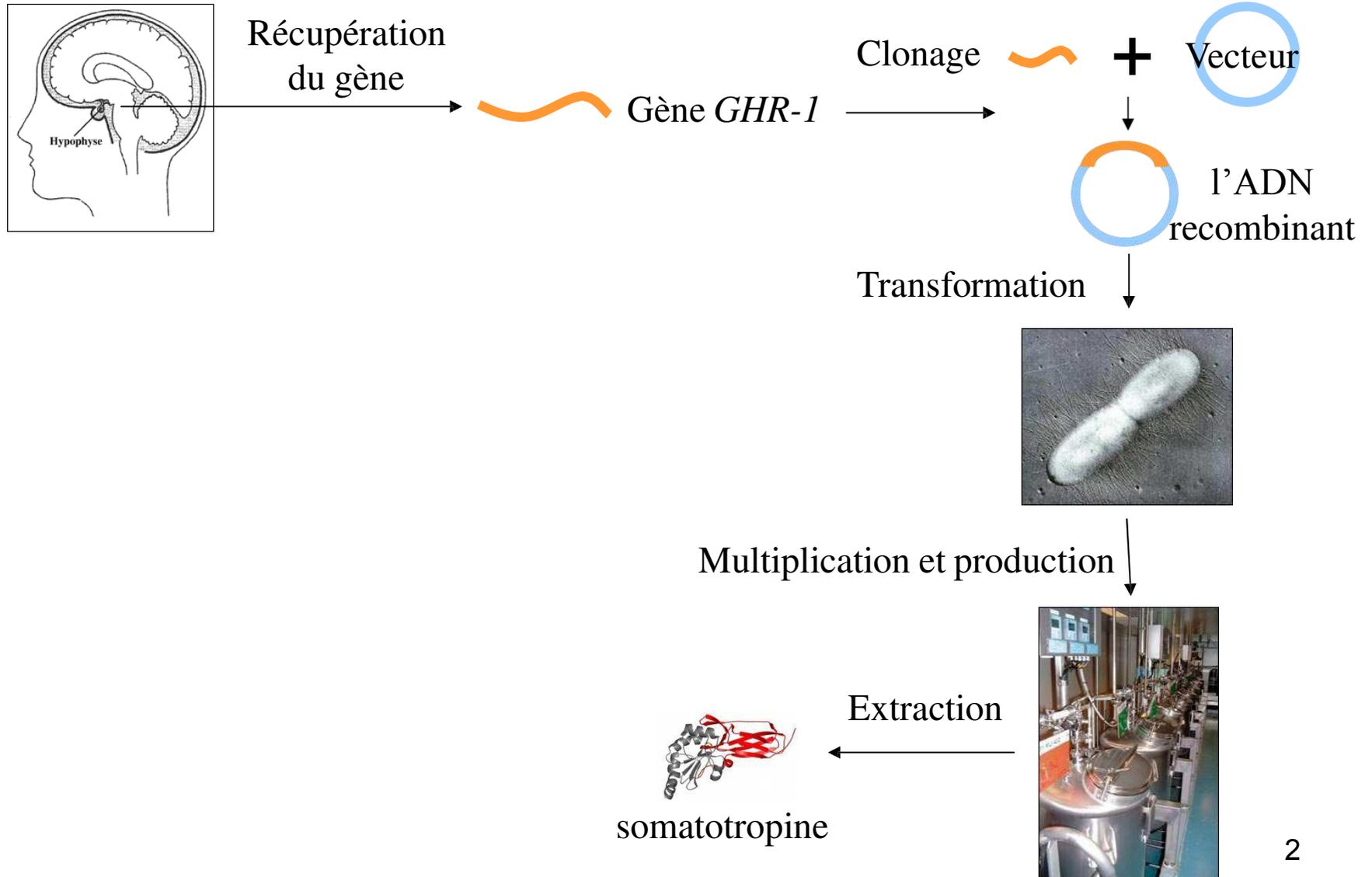
Deuxième partie

Biologie moléculaire et génie génétique

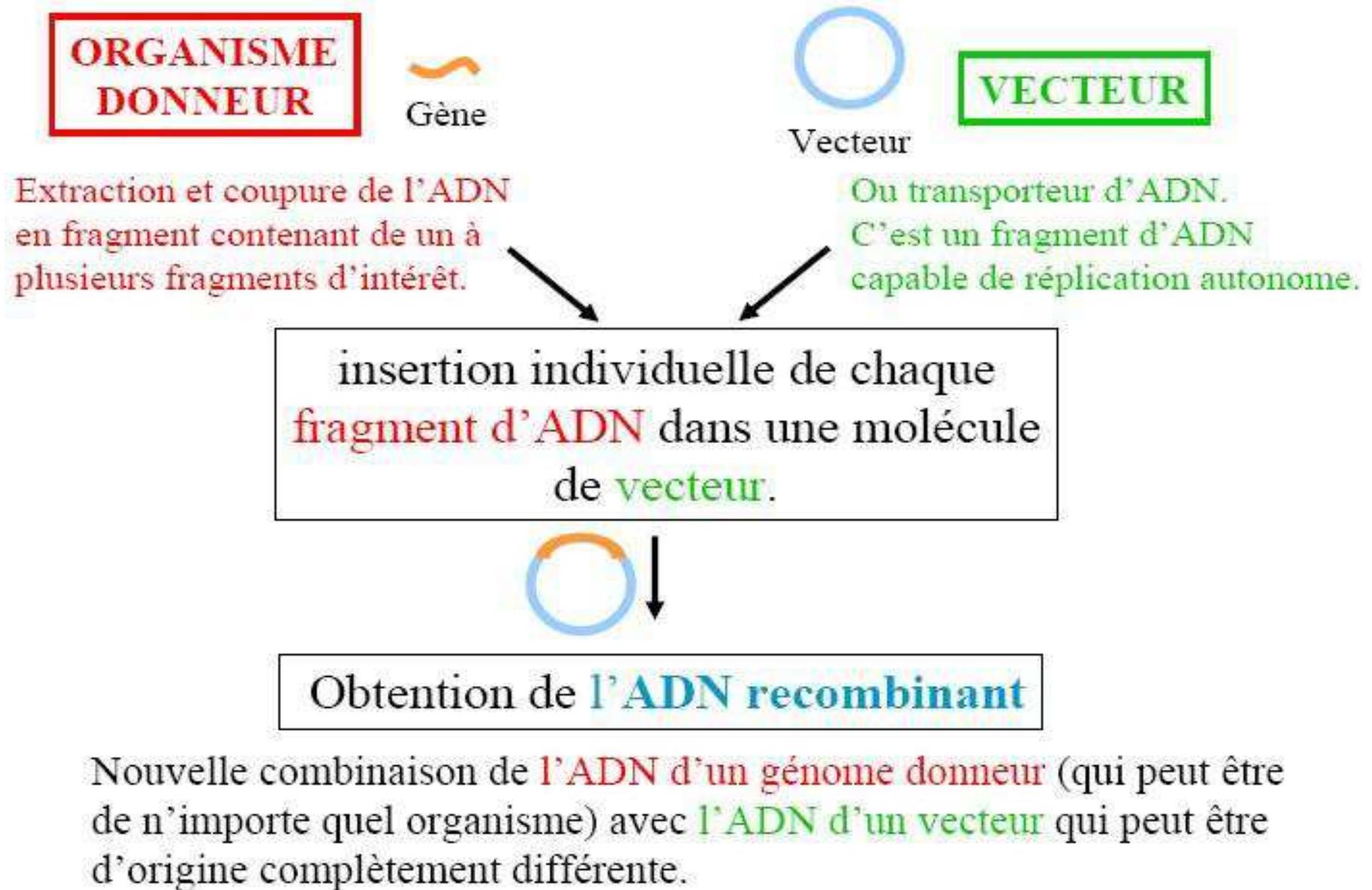
Responsable du module: Dr. BAKLI Mahfoud

E-mail: mahfoud.bakli@gmail.com

Concept du clonage génétique

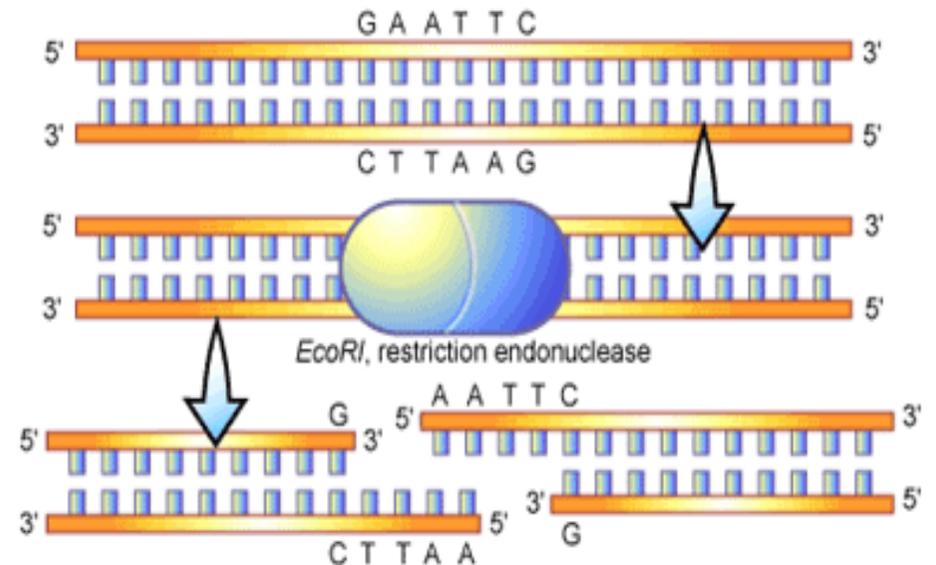
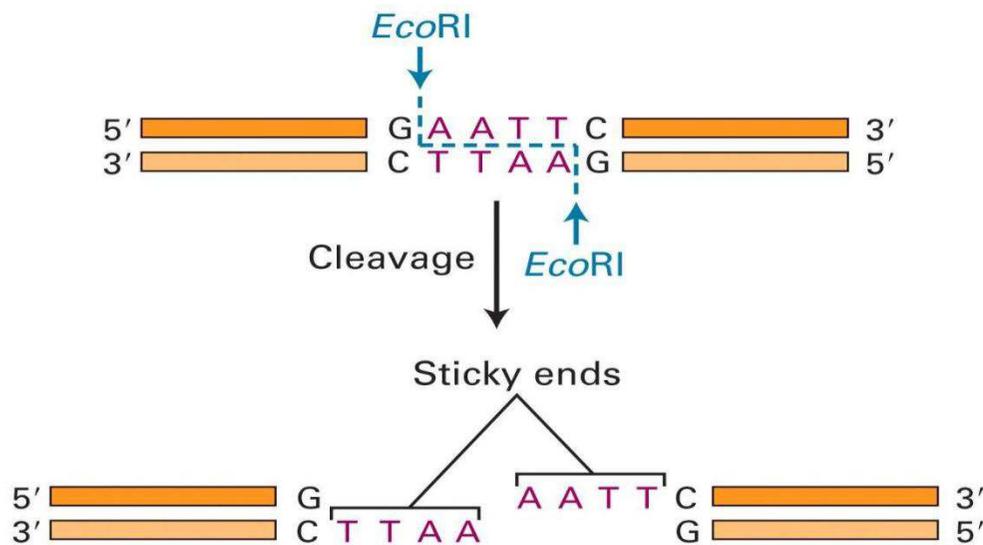


Concept du clonage génétique



Les enzymes de restrictions

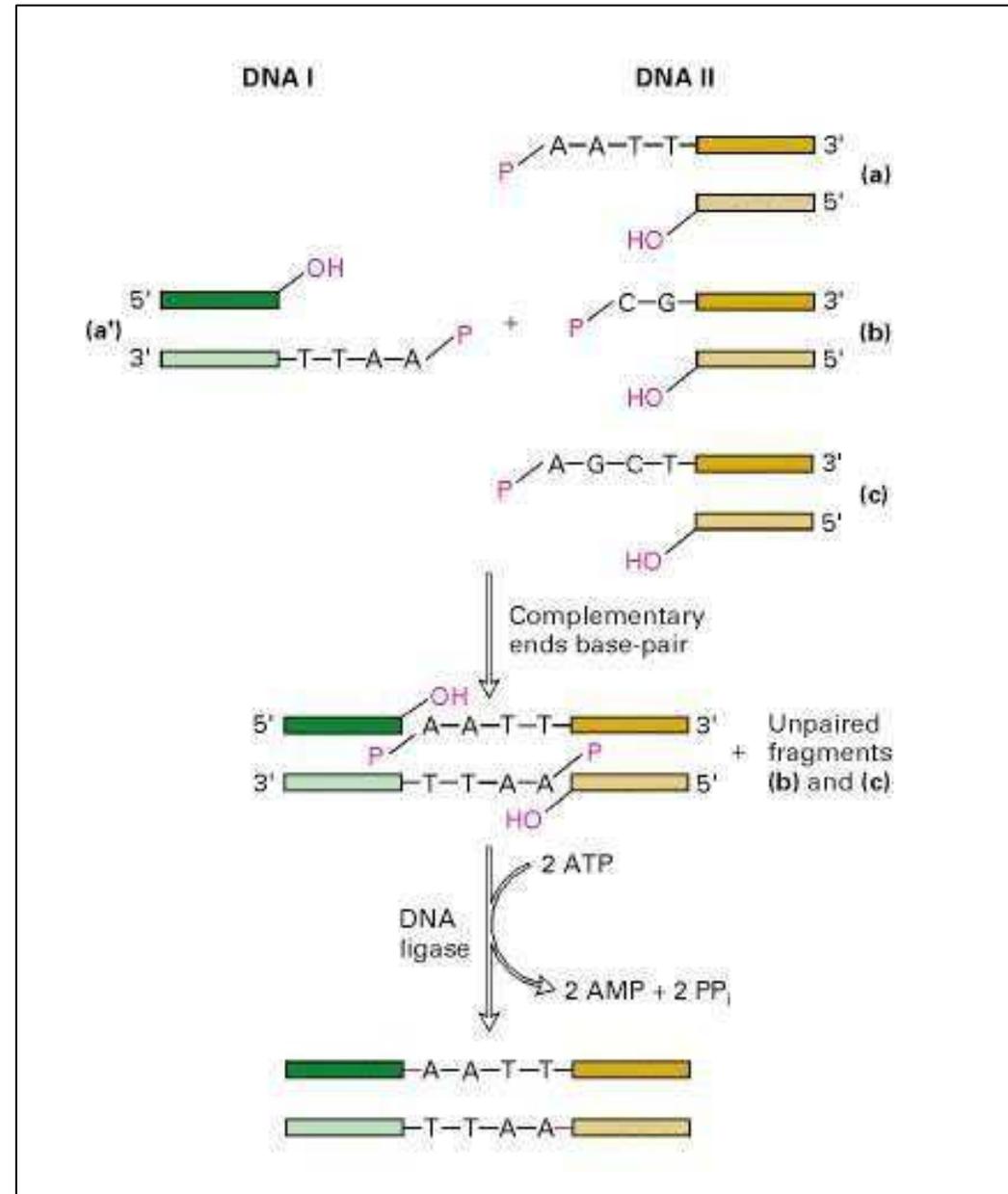
Définition: Les enzymes de restrictions sont des enzymes (Endonucléase) bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.



La ligation

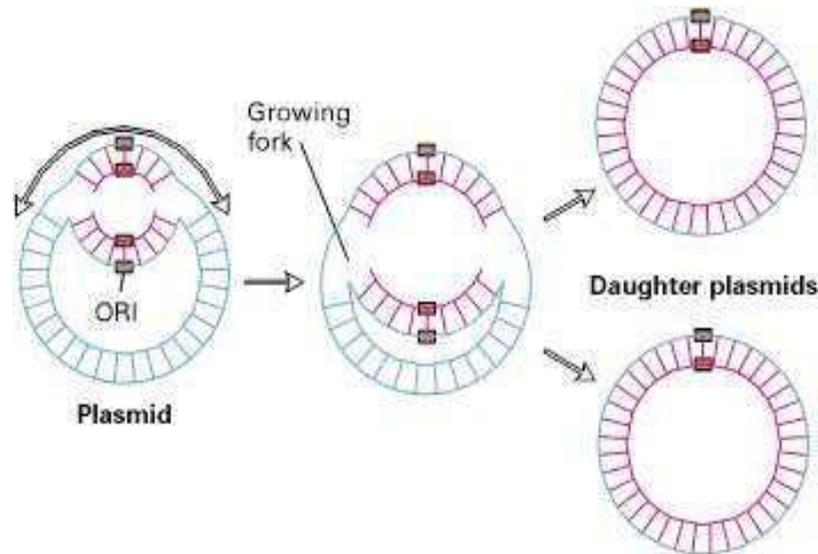
- Propriétés de la ligase

- La ligase est une enzyme qui est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.
- La ligase lie de façon covalente deux molécules ayant des extrémités compatibles

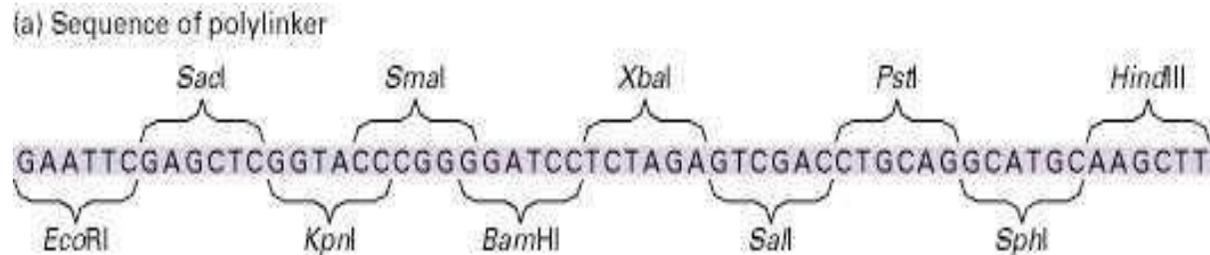


Propriétés des vecteurs de clonage

- Le vecteur de clonage va « transporter » le fragment d'ADN que l'on va cloner
- Capables de réplication autonome dans une cellule hôte donnée (mini chromosome)
(origine de réplication de type procaryotique et / ou eucaryotique)

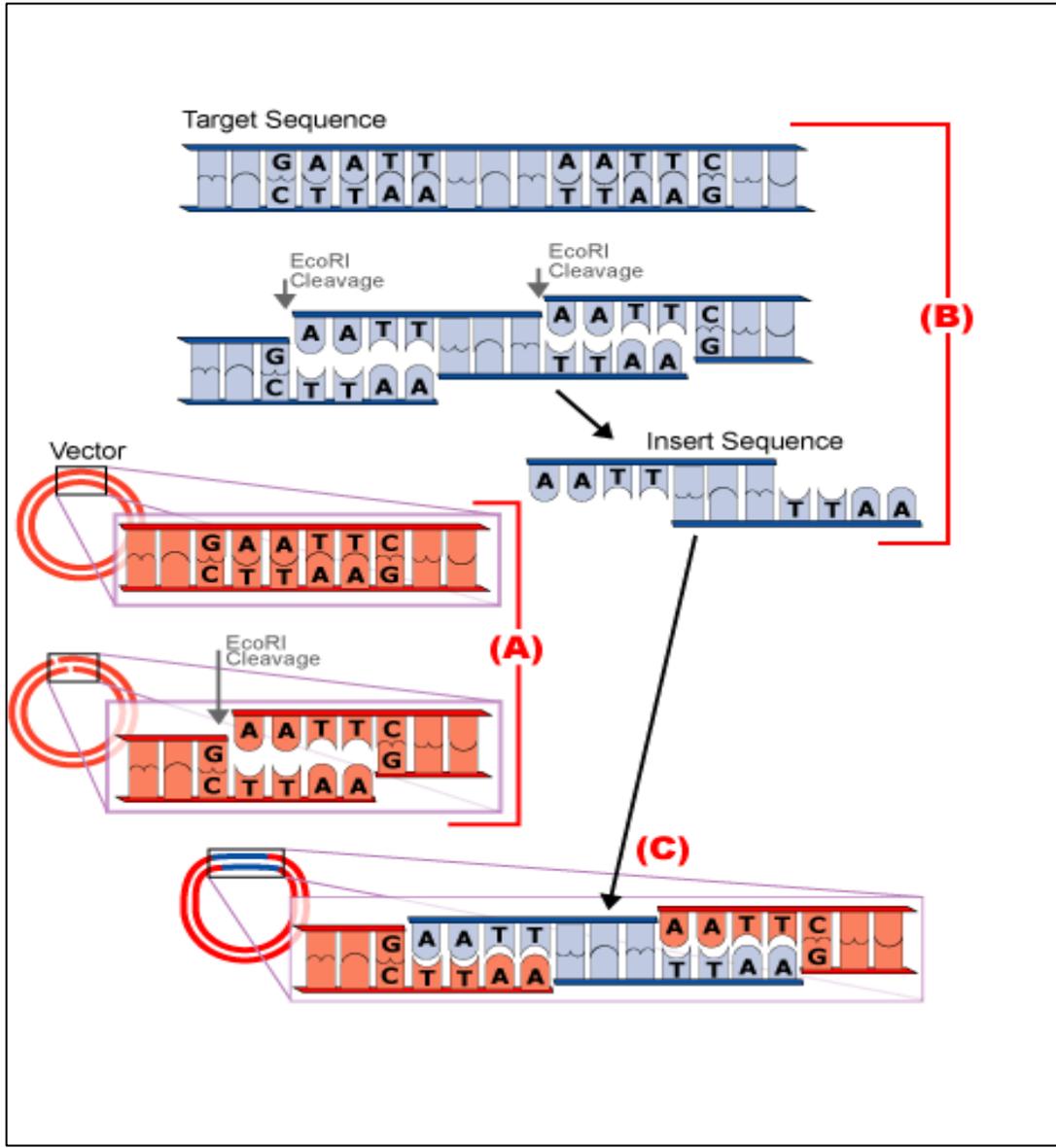
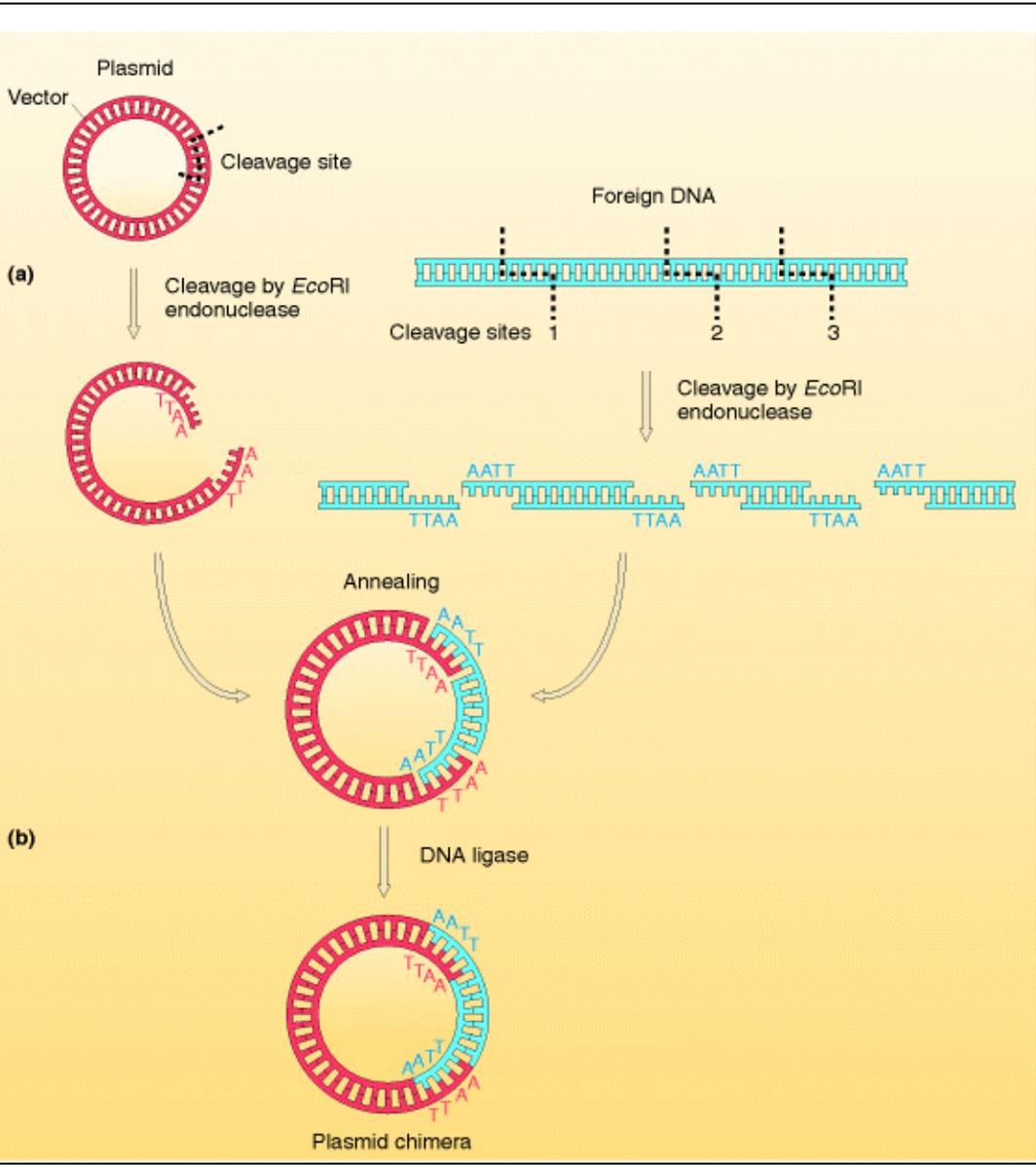


- Possède un polylinker ou site multiple de clonage



- Présenter un système de sélection : résistance aux antibiotiques

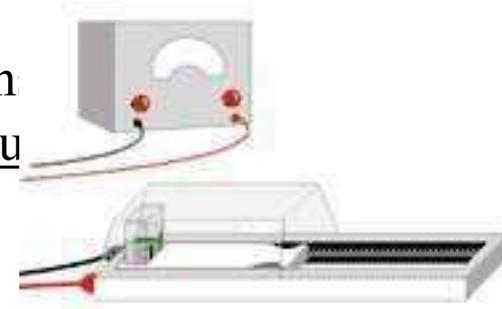
Résumé sur l'ADN recombinant



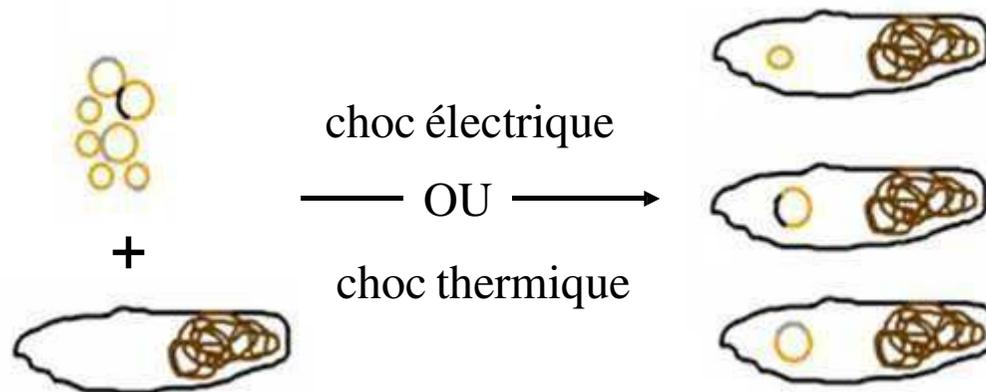
Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

- Transformation des cellules procaryotes.

Cas d'un vecteur plasmidique: l'ADN est introduit dans des cellules hôtes traitées spécialement le plus souvent par choc thermique ou choc électrique.

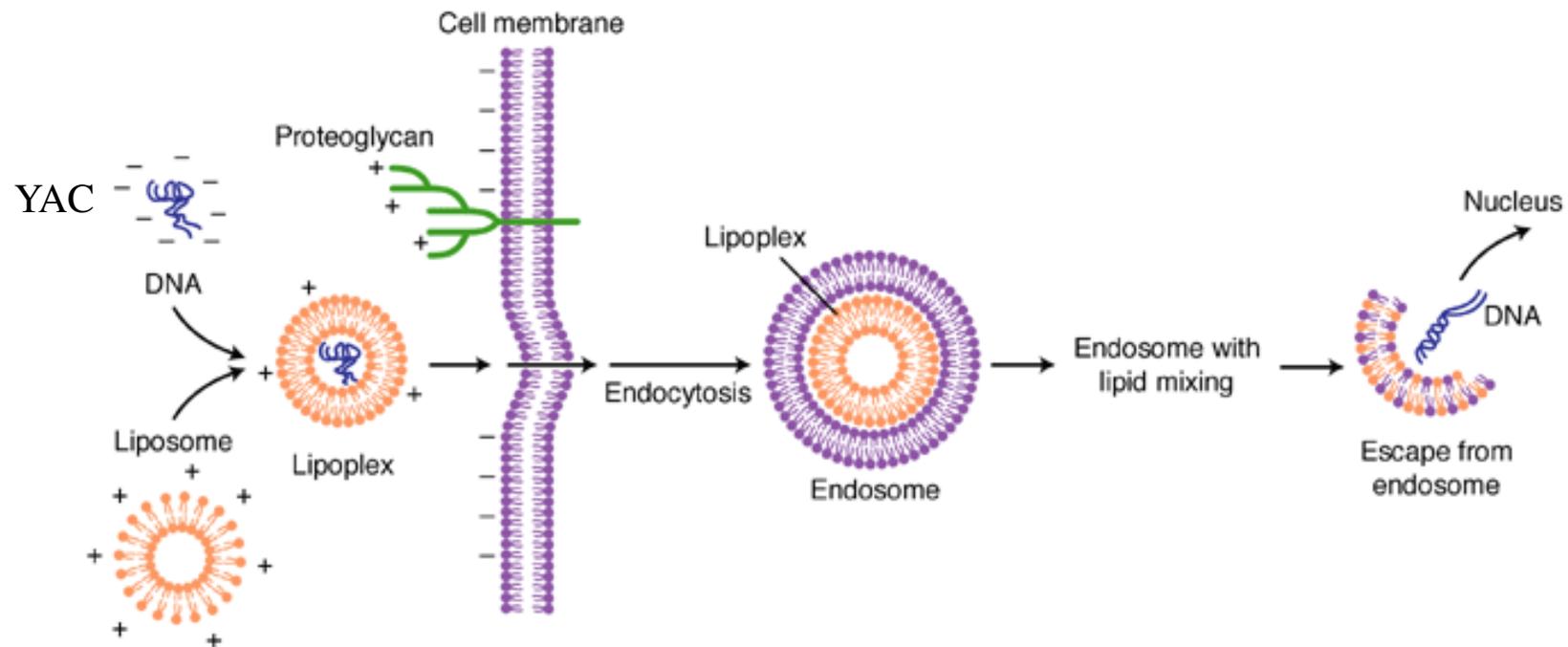


électroporateur



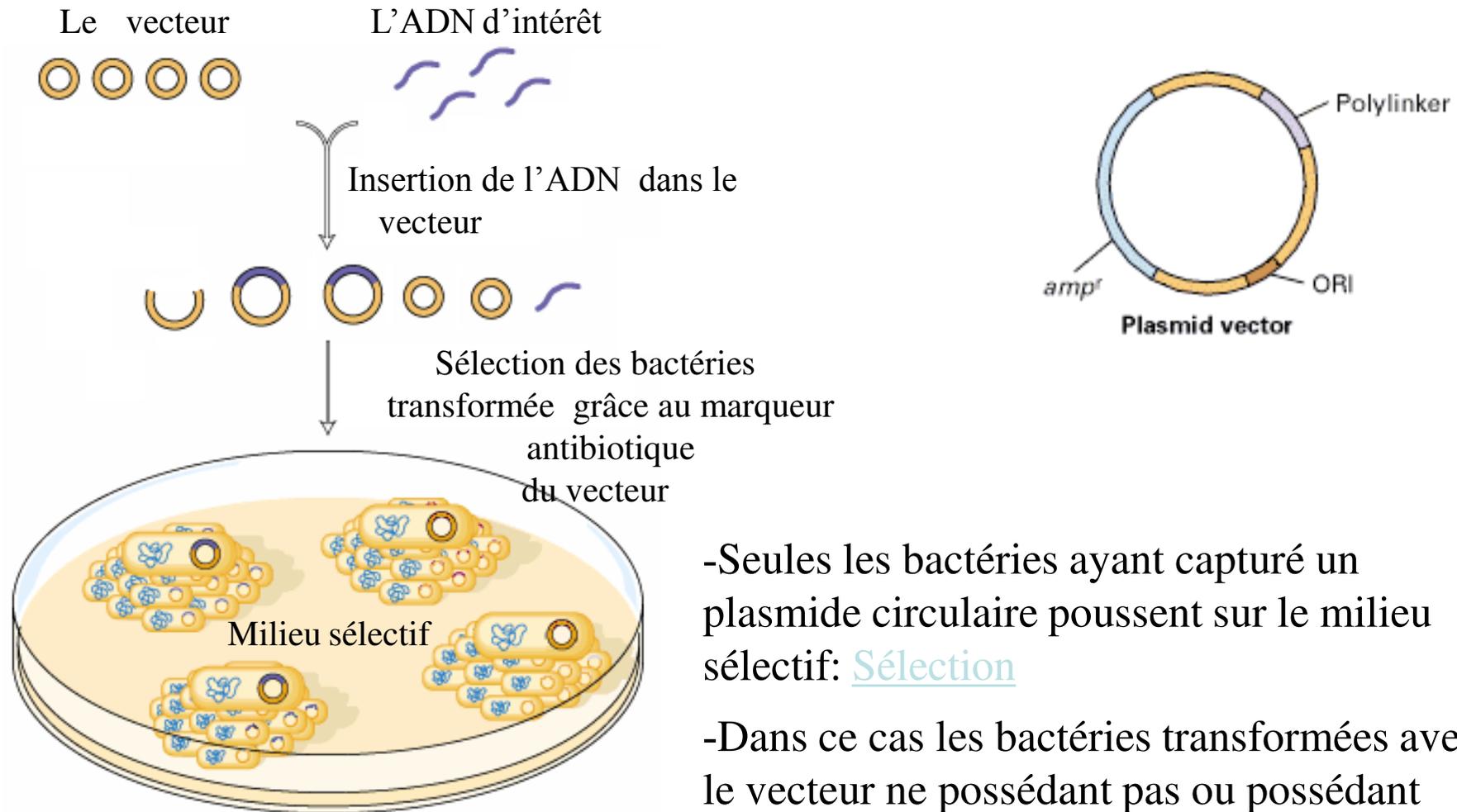
Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

- Transfection des cellules eucaryotes: **Cas d'un vecteur YAC**



- L'ADN est introduit dans une vésicule lipidique appelée « liposome »
- Fusion de la vésicule avec l'endosome et libération de l'ADN

Identification des clones intéressants

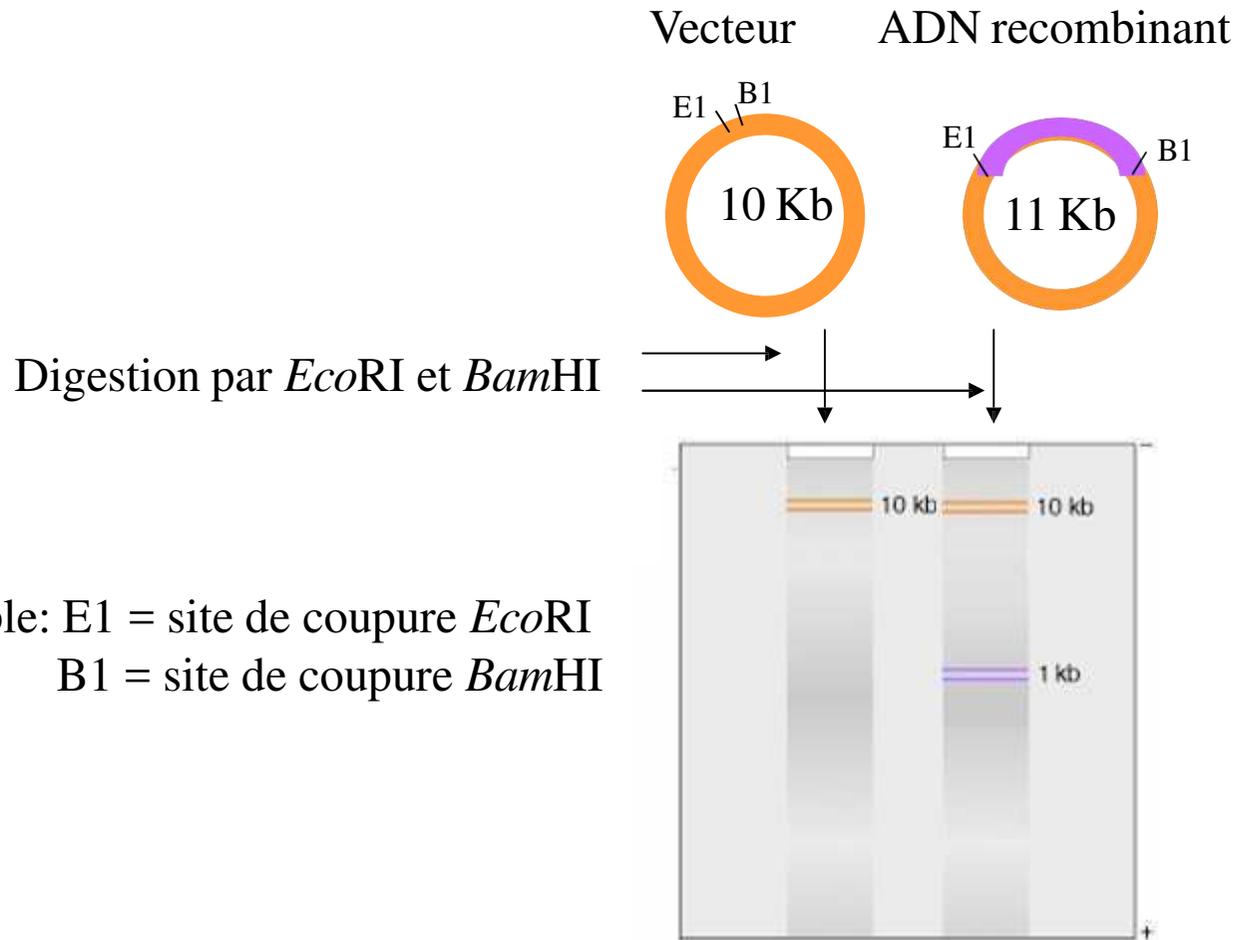


-Seules les bactéries ayant capturé un plasmide circulaire poussent sur le milieu sélectif: Sélection

-Dans ce cas les bactéries transformées avec le vecteur ne possédant pas ou possédant l'insert sont sélectionnées --> un criblage est nécessaire

Criblage -screening- des clones intéressants

- Méthode de cartographie par restriction



Comment optimiser le clonage ?

Les facteurs limitants du clonage

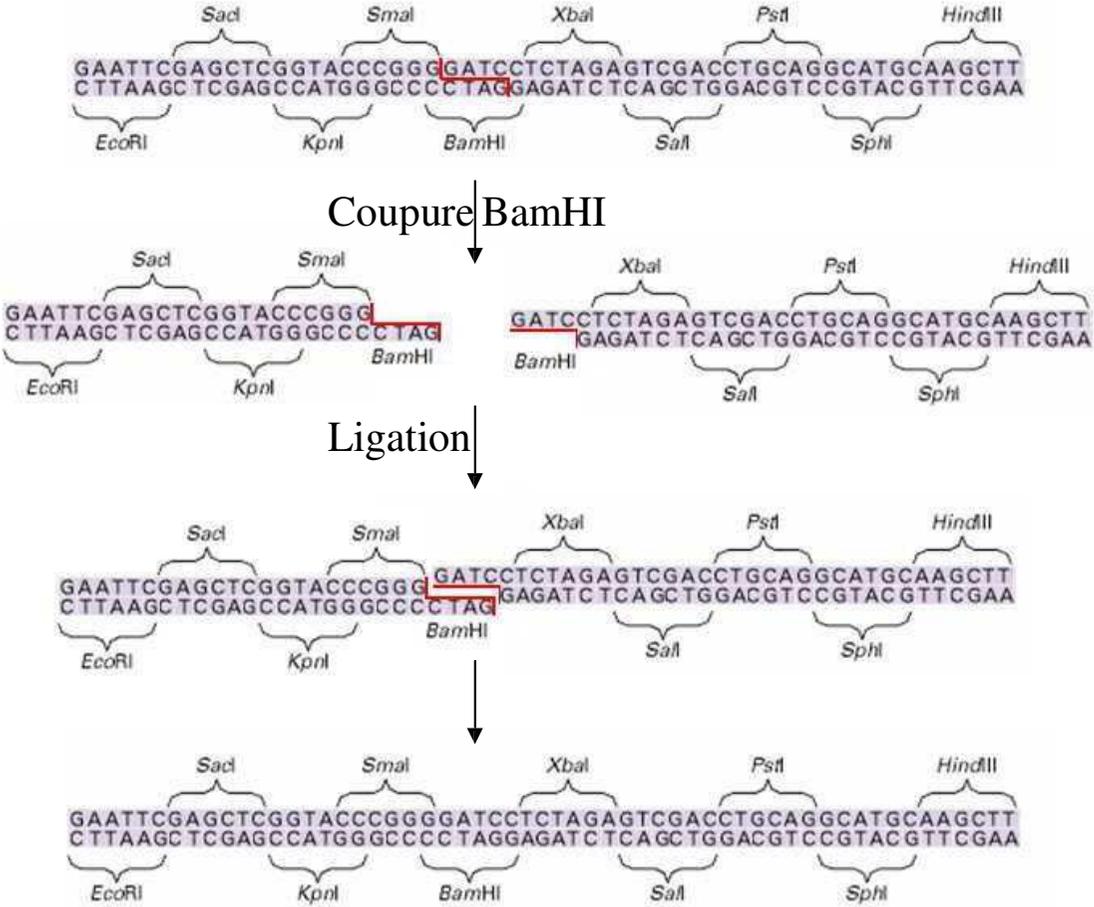
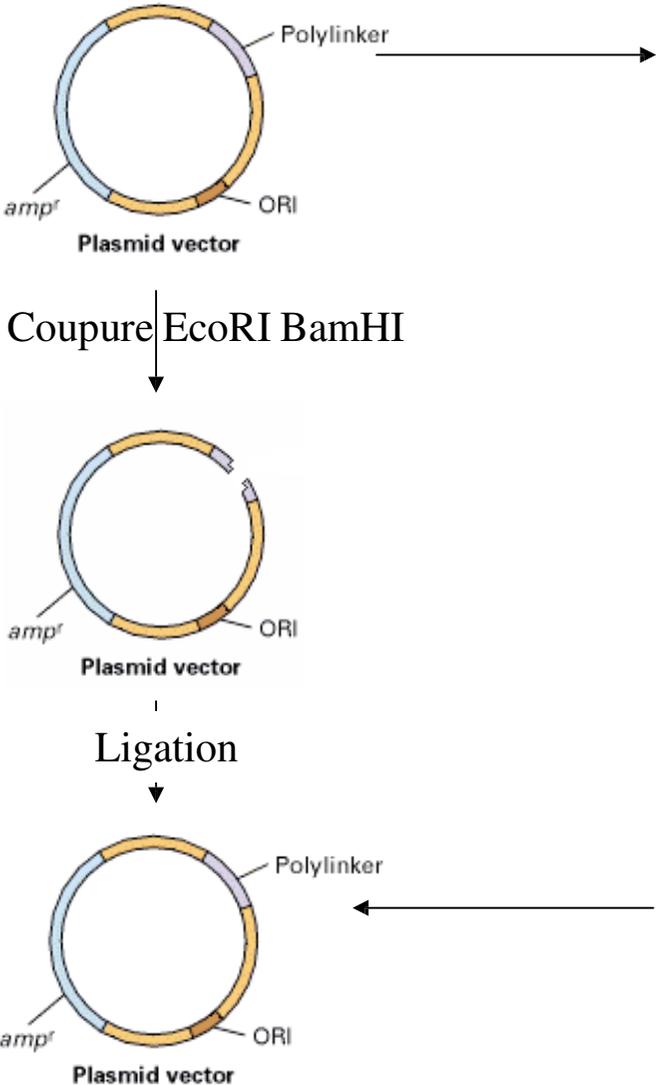
Objectif

Avoir à la fin de l'étape de sélection un maximum de « clones positifs »
c.à.d des bactéries qui ont inséré un ADN recombinant et pourvoir les identifier rapidement.

Comment?

- Limiter la refermeture du vecteur de clonage (plasmide)
- Utiliser des méthodes permettant de différencier directement les bactéries ayant inséré un ADN recombinant de celles ayant insérées un vecteur

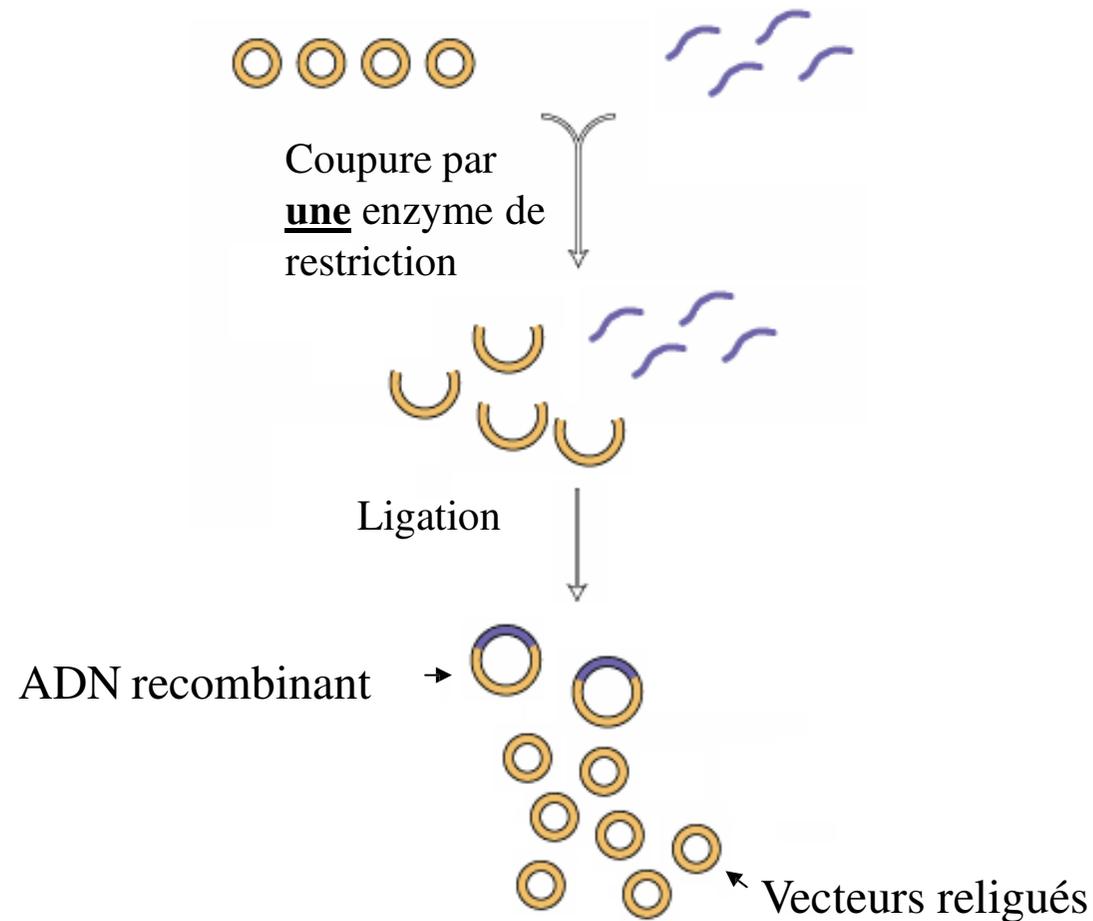
Limiter la refermeture du vecteur de clonage



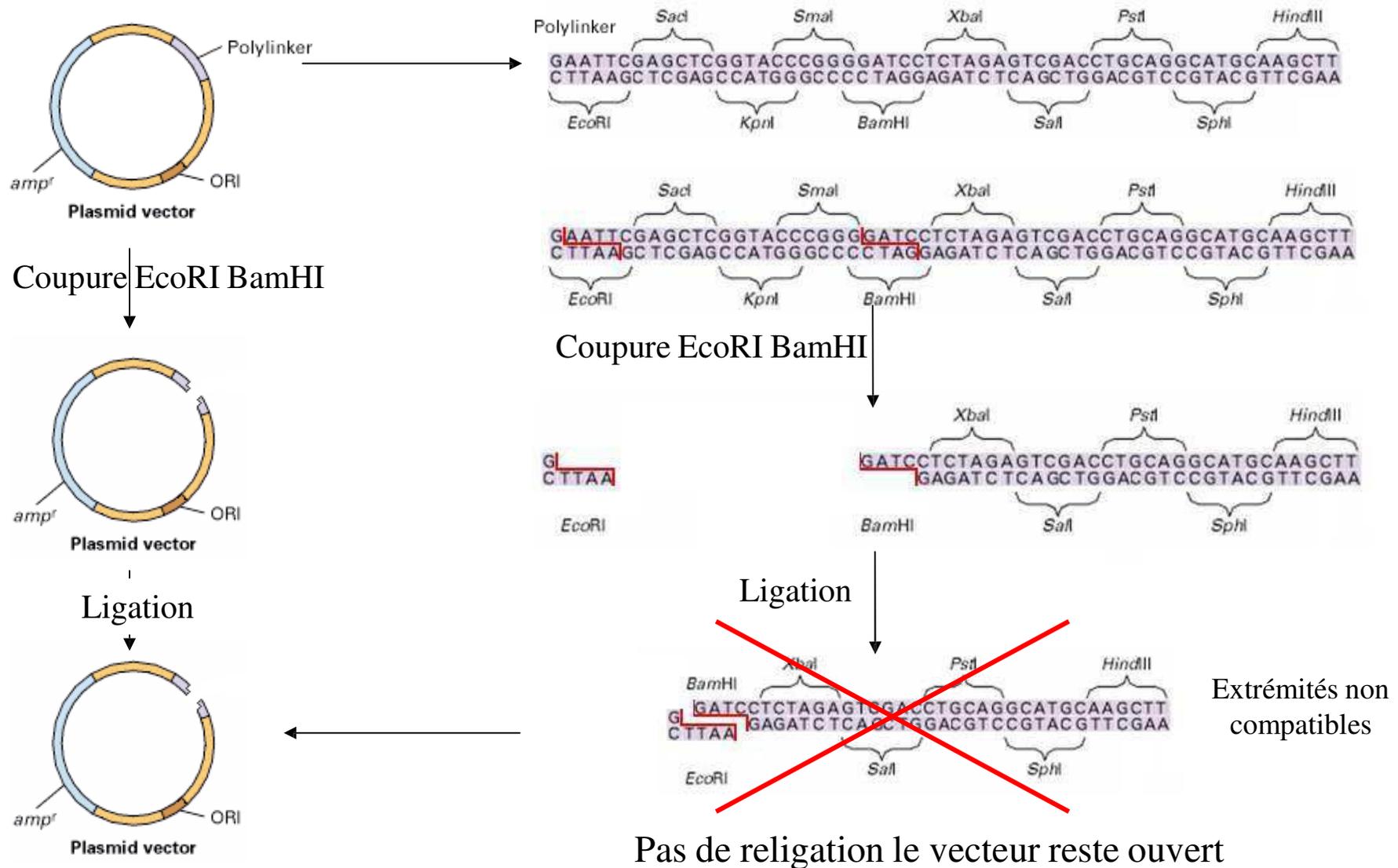
Religation du vecteur qui se referme

Pourquoi limiter la refermeture du vecteur de clonage

La majorité des ADN obtenue après ligation sont des vecteurs refermés sur eux même

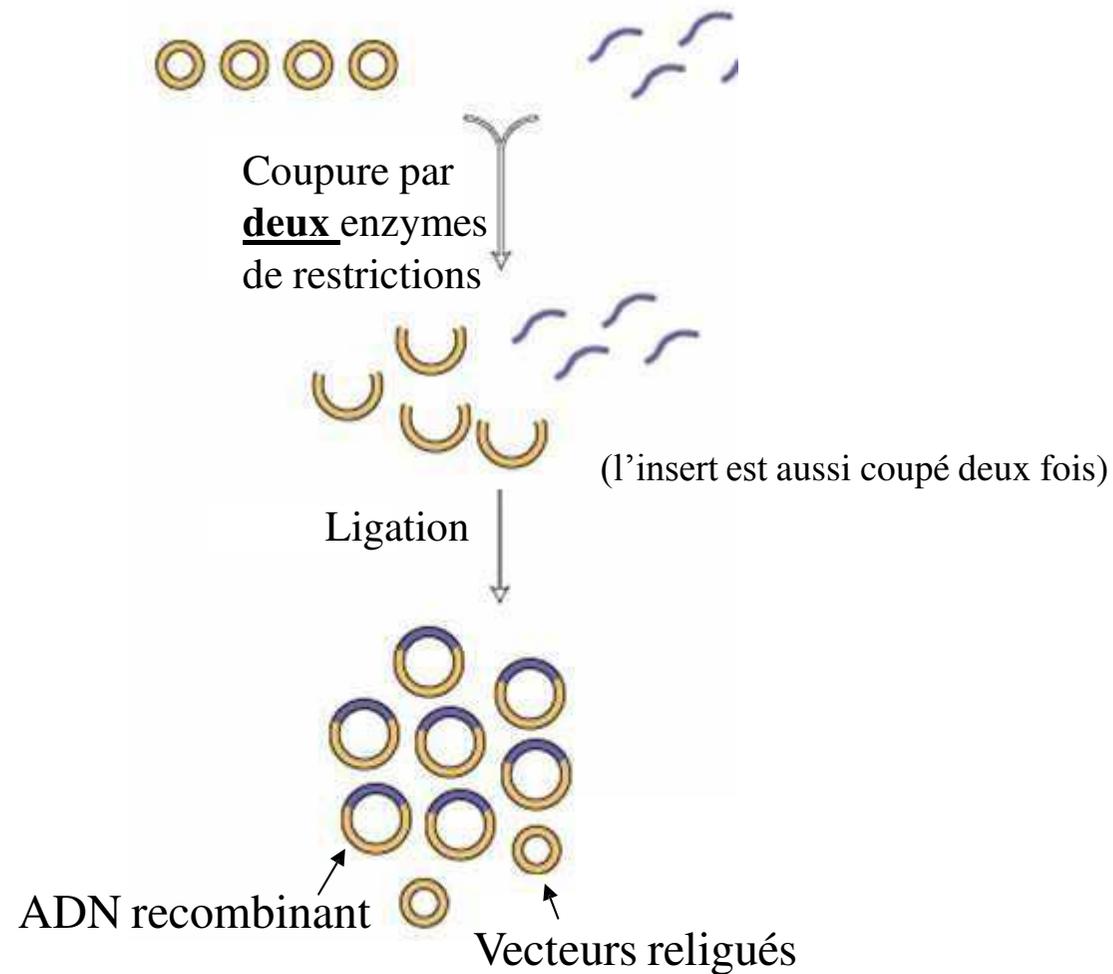


Utilisation de deux enzymes de restrictions



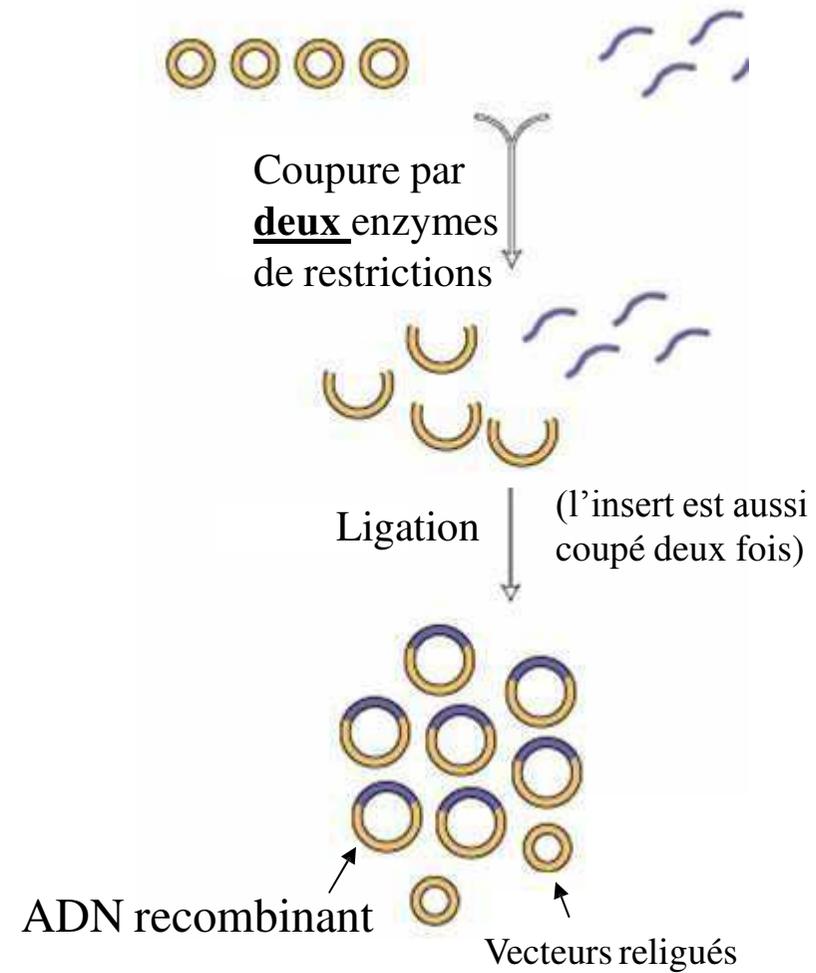
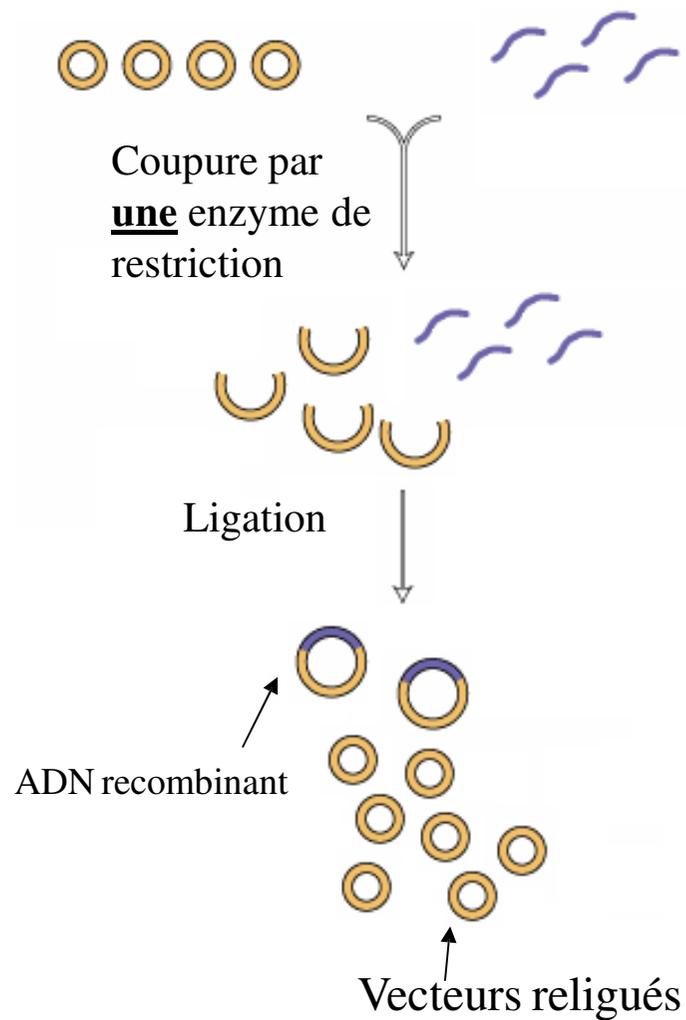
Utilisation de deux enzymes de restrictions

La majorité des ADN obtenue après ligation sont des vecteurs recombines



Bilan

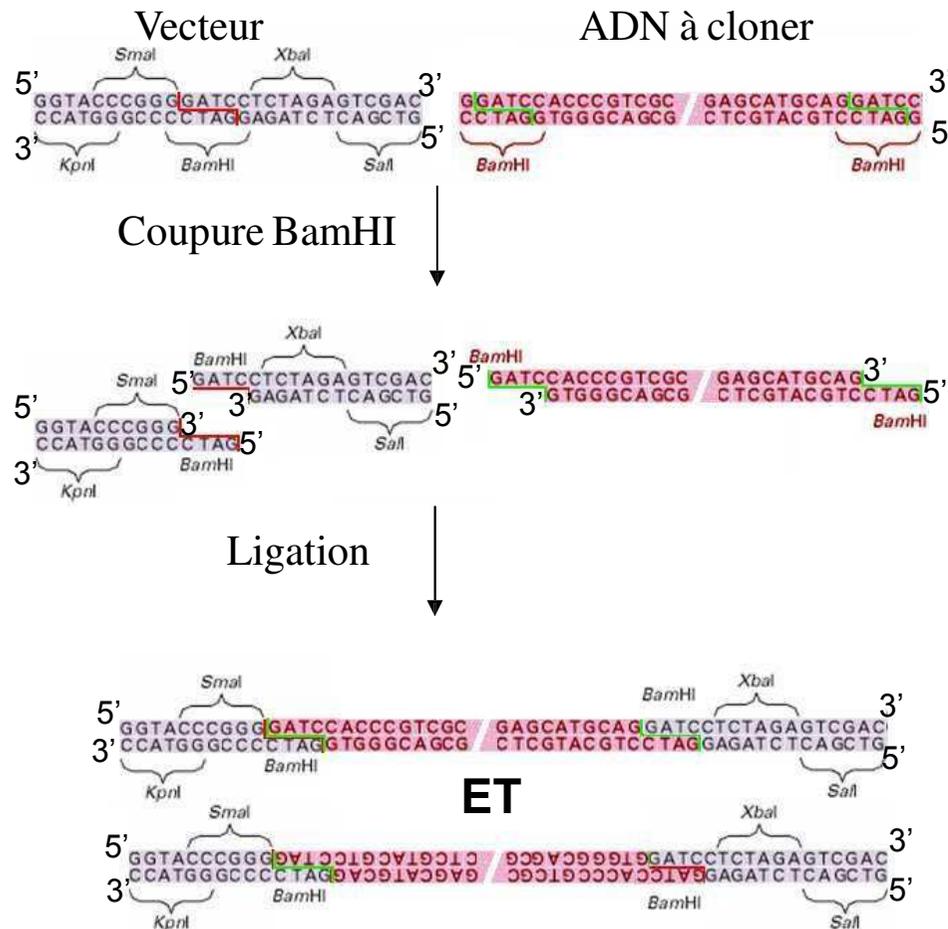
En utilisant deux enzymes ont augmente la quantité d'ADN recombinant



Orientation du clonage

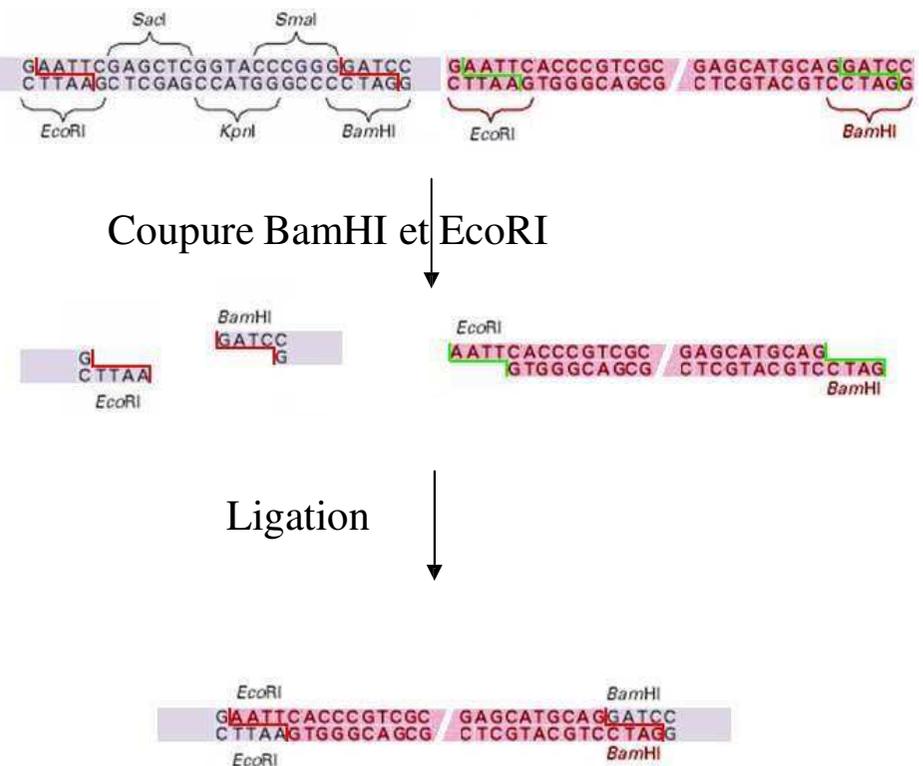
L'utilisation de deux enzymes permet **d'orienter le sens** du clonage de l'insert d'ADN

Cas d'une seule enzyme



Le fragment peut être orienté dans les deux sens

Cas de deux enzymes



Le fragment peut être orienté dans un seul sens

Les facteurs limitants du clonage

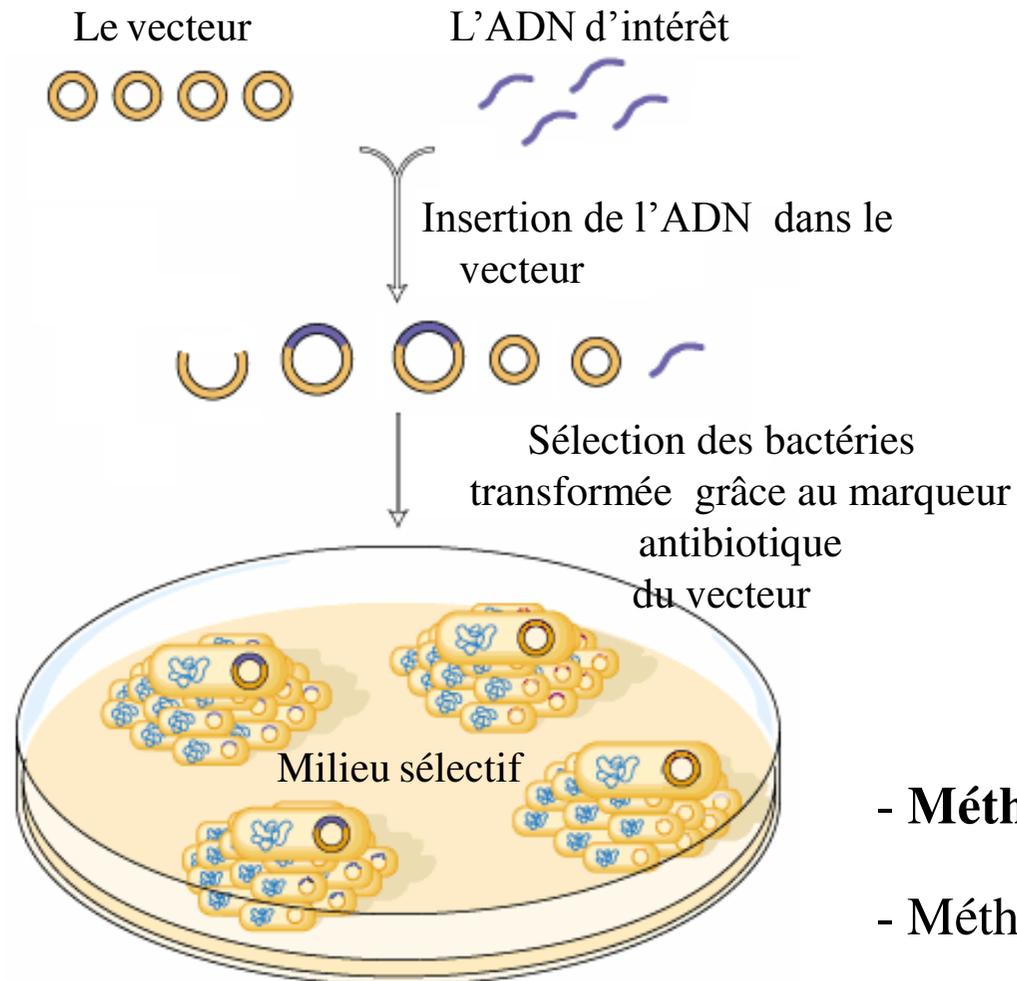
Objectif

Avoir à la fin de l'étape de sélection un maximum de « clones positifs »
c.à.d des bactéries qui ont inséré un ADN recombinant et pourvoir les identifier rapidement.

Comment?

- Limiter la refermeture du vecteur de clonage (plasmide)
- Utiliser des méthodes permettant de différencier directement les bactéries ayant inséré un ADN recombinant de celles ayant insérées un vecteur

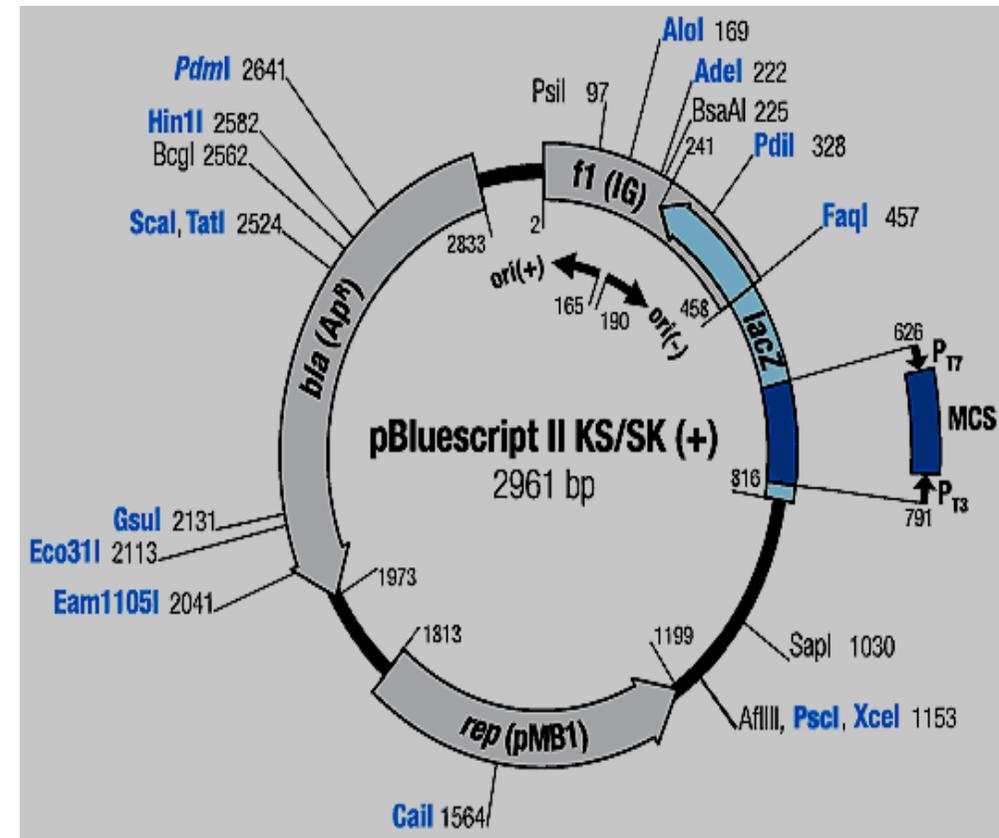
Les différentes méthodes de criblage



- **Méthode du test blanc-bleu**
- Méthode de sensibilité aux antibiotiques

La méthode de sélection Blanc-bleu

- La méthode de sélection blanc-bleu repose sur la présence d'un gène particulier sur le plasmide : le gène *lacZ*
- Le gène *lacZ* code pour une enzyme la beta galactosidase
- La beta galactosidase dégrade le X-gal en un composé bleu
- La séquence codant du gène *lacZ* contient le site multiple de clonage (MCS ou polylinker)

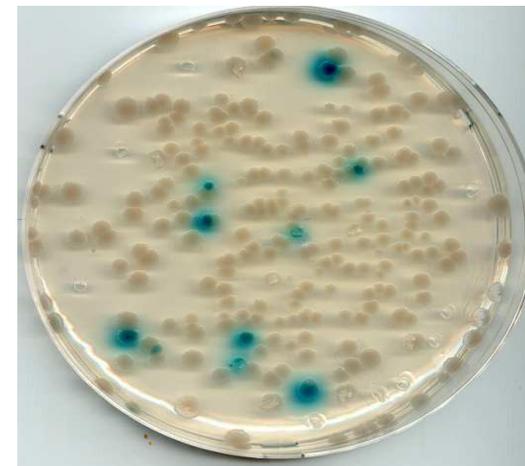
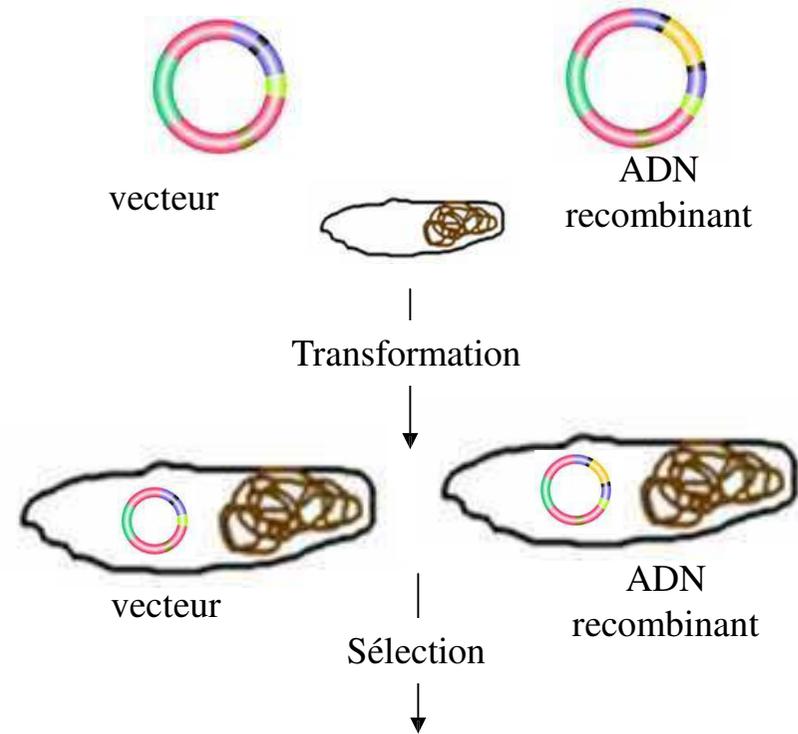


Attention tout les plasmides n'ont pas le gènes *lacZ* !!!!!

La méthode de sélection Blanc-bleu(2)

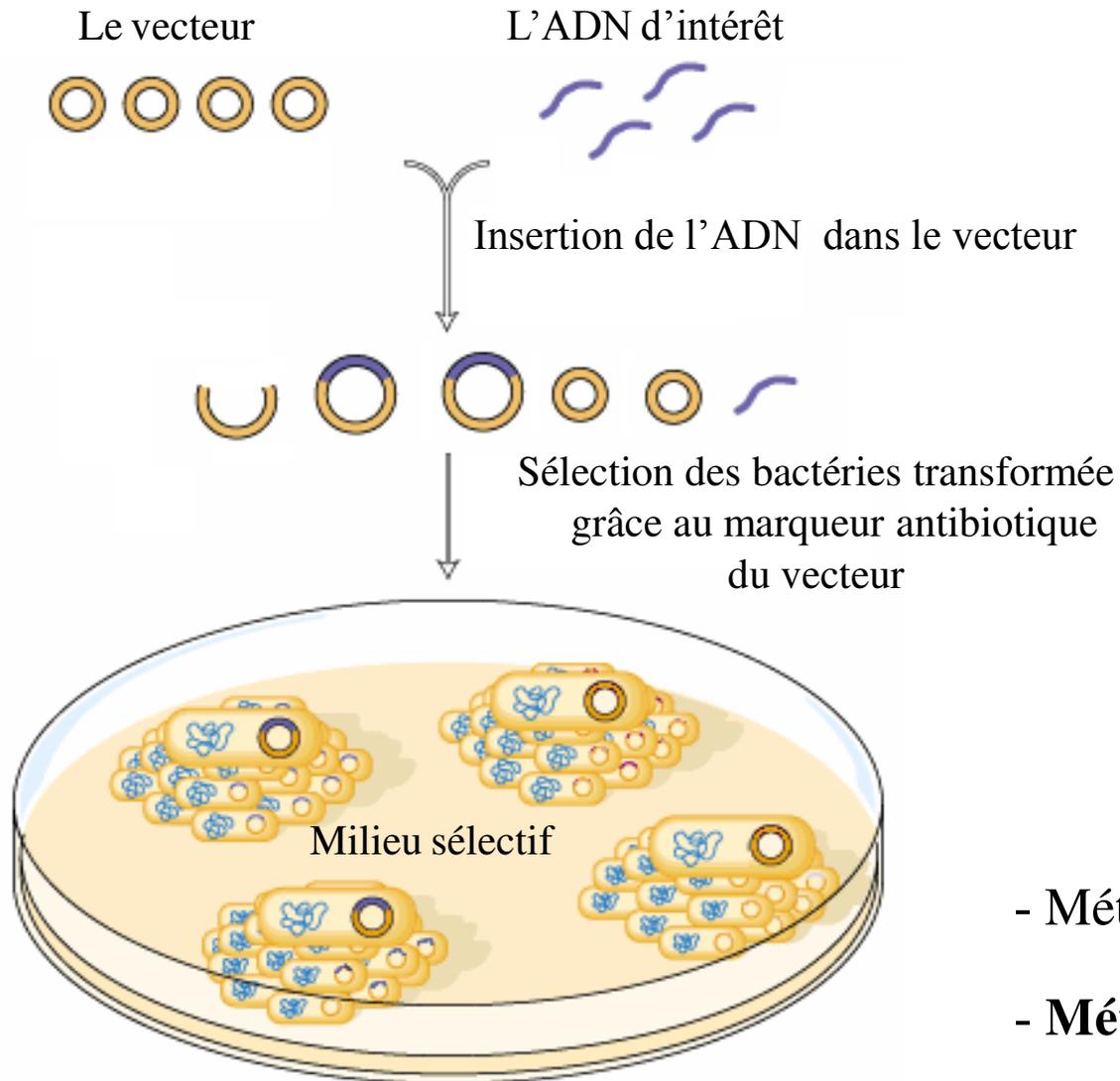
Exemple du test Blanc-bleu

Pour que l'on puisse faire une sélection blanc-bleu il faut impérativement que le plasmide porte le gène *lacZ*



Antibiotique + X-gal

Les différentes méthodes de criblage

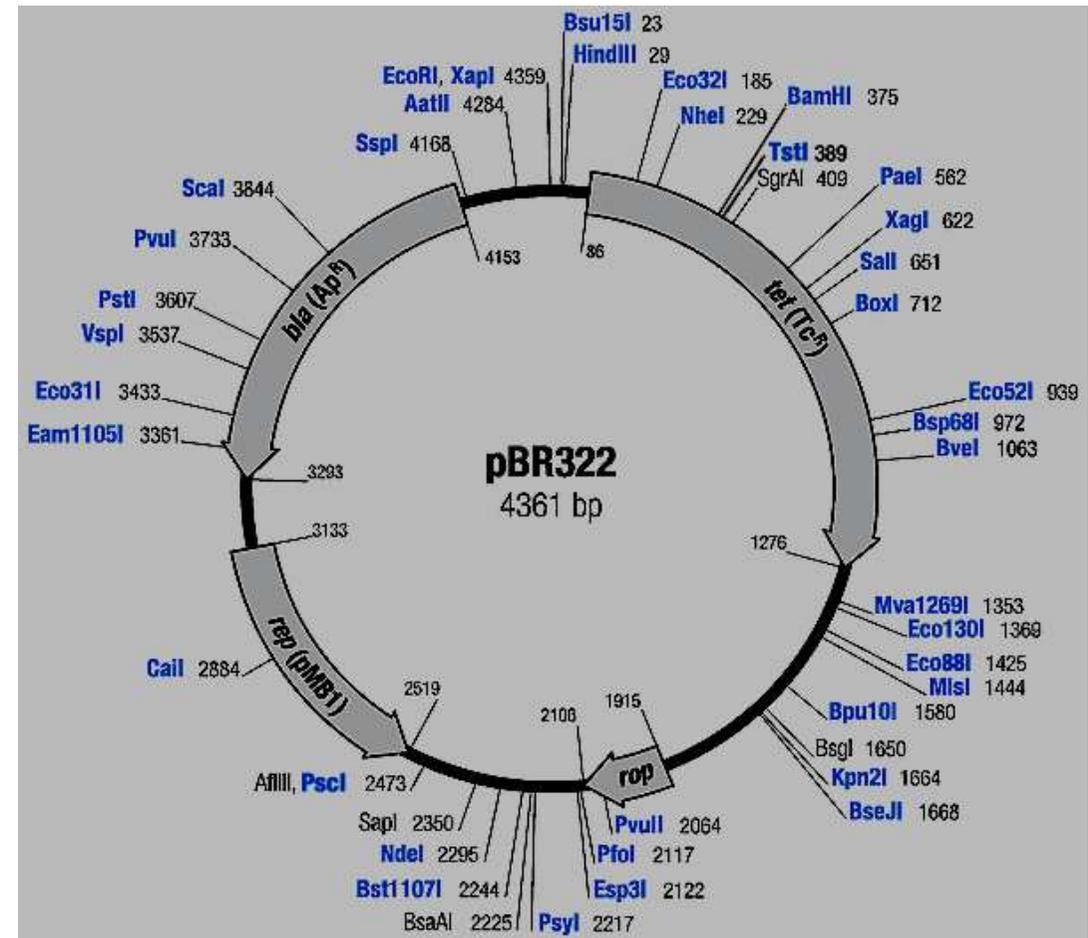


- Méthode du test blanc-bleu
- **Méthode de sensibilité aux antibiotiques**

Méthode de sensibilité aux antibiotiques

- La méthode de sélection par sensibilité aux antibiotiques repose sur la présence d'un gène supplémentaire de résistance aux antibiotiques

- La séquence codant de ce second gène de résistance aux antibiotiques le site multiple de clonage



Méthode de sensibilité aux antibiotiques

- Méthode de sensibilité aux antibiotiques

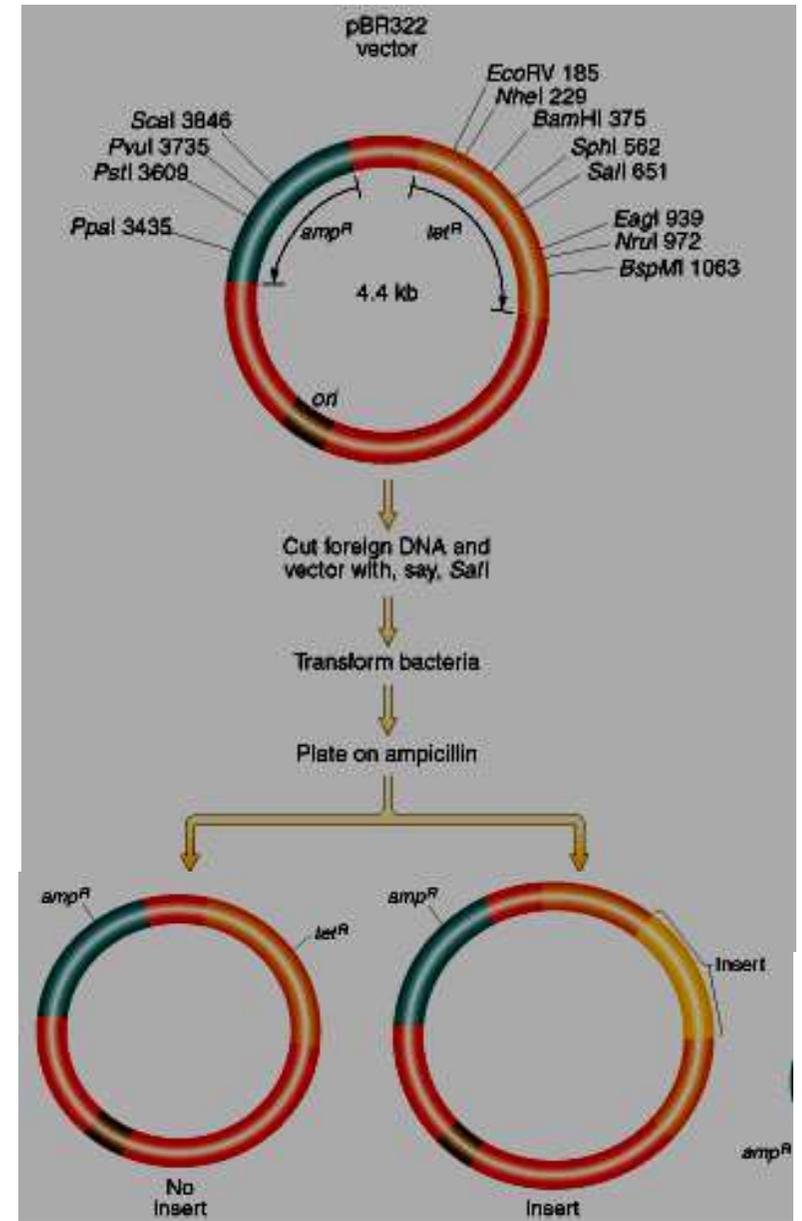
Principe: L'insertion du fragment d'ADN conduit à une interruption d'un gène de résistance à un antibiotique ici le gène *tet* responsable la résistance à la tétracycline

-Les bactéries ayant incorporées un plasmide recombinant n'auront pas le gène *tet* fonctionnel

-> elles seront sensibles à la tétracycline

-Les bactéries ayant incorporées un plasmide non-recombinant auront le gène *tet* fonctionnel

-> elle seront résistantes à la tétracycline



Méthode de sensibilité aux antibiotiques

- Exemple méthode de sensibilité aux antibiotiques

Dans cette méthode il y a deux sélections successives sur antibiotique:

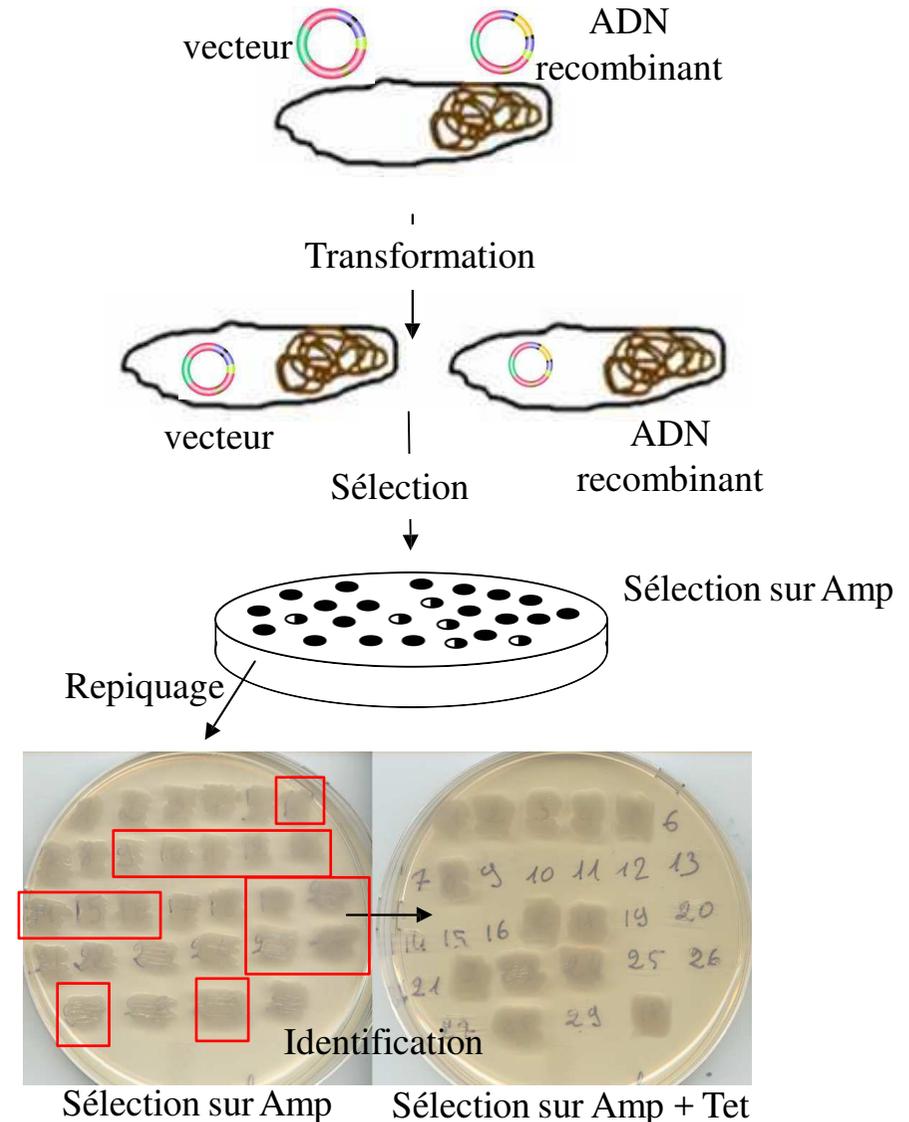
→ 1 ère sélection sur ampicilline

Les bactéries ayant incorporées le vecteur vide ou le plasmide recombinant vont pousser

→ 2 ème sélection sur tétracycline

Les bactéries ayant incorporées le vecteur vide vont pousser pas les autres

On va déterminer les bactéries ayant incorporées le plasmide recombinant par **identification**



Les différents vecteurs de clonage

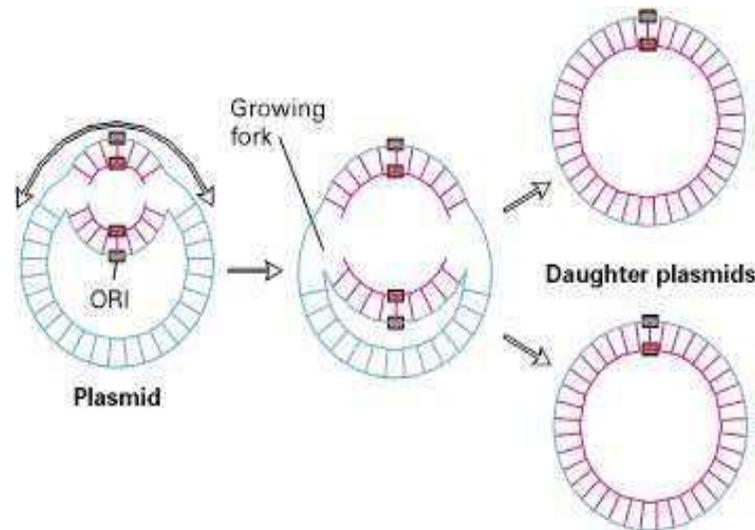
Différents vecteurs de clonage

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

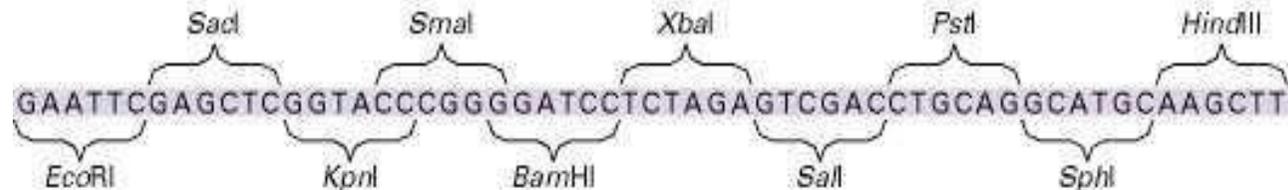
Propriétés des vecteurs de clonage

- Capables de réplication autonome dans une cellule hôte donnée (origine de réplication de type procaryotique et/ ou eucaryotique)



- Possède un polylinker ou site multiple de clonage

(a) Sequence of polylinker

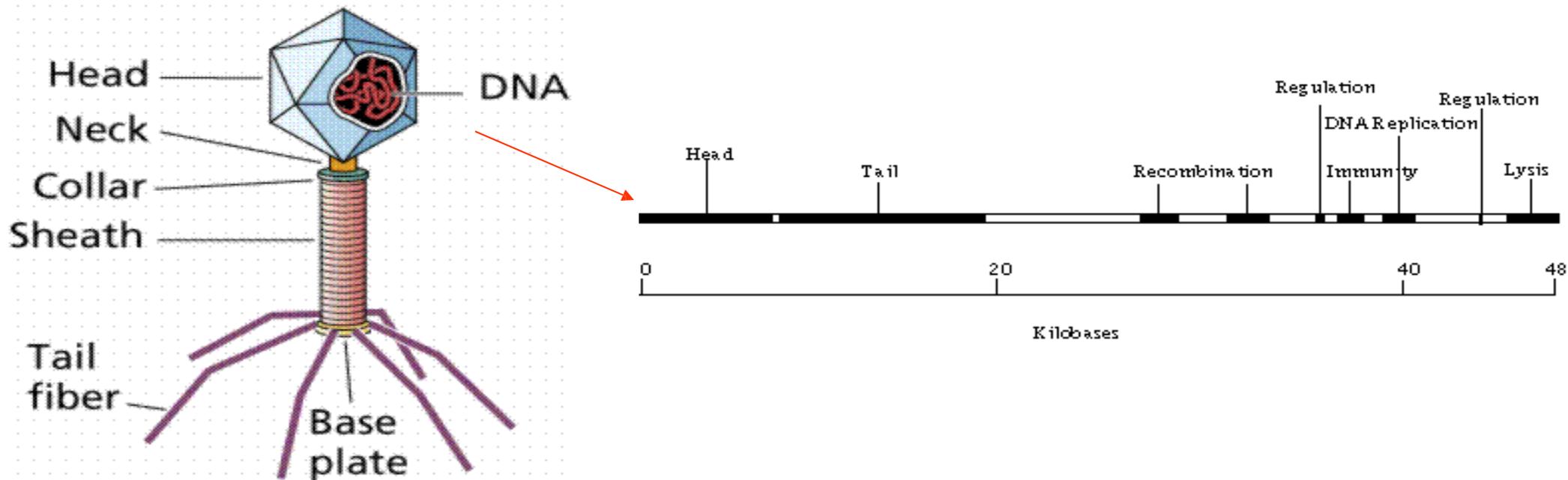


- Présenter un système de sélection : résistance aux antibiotiques

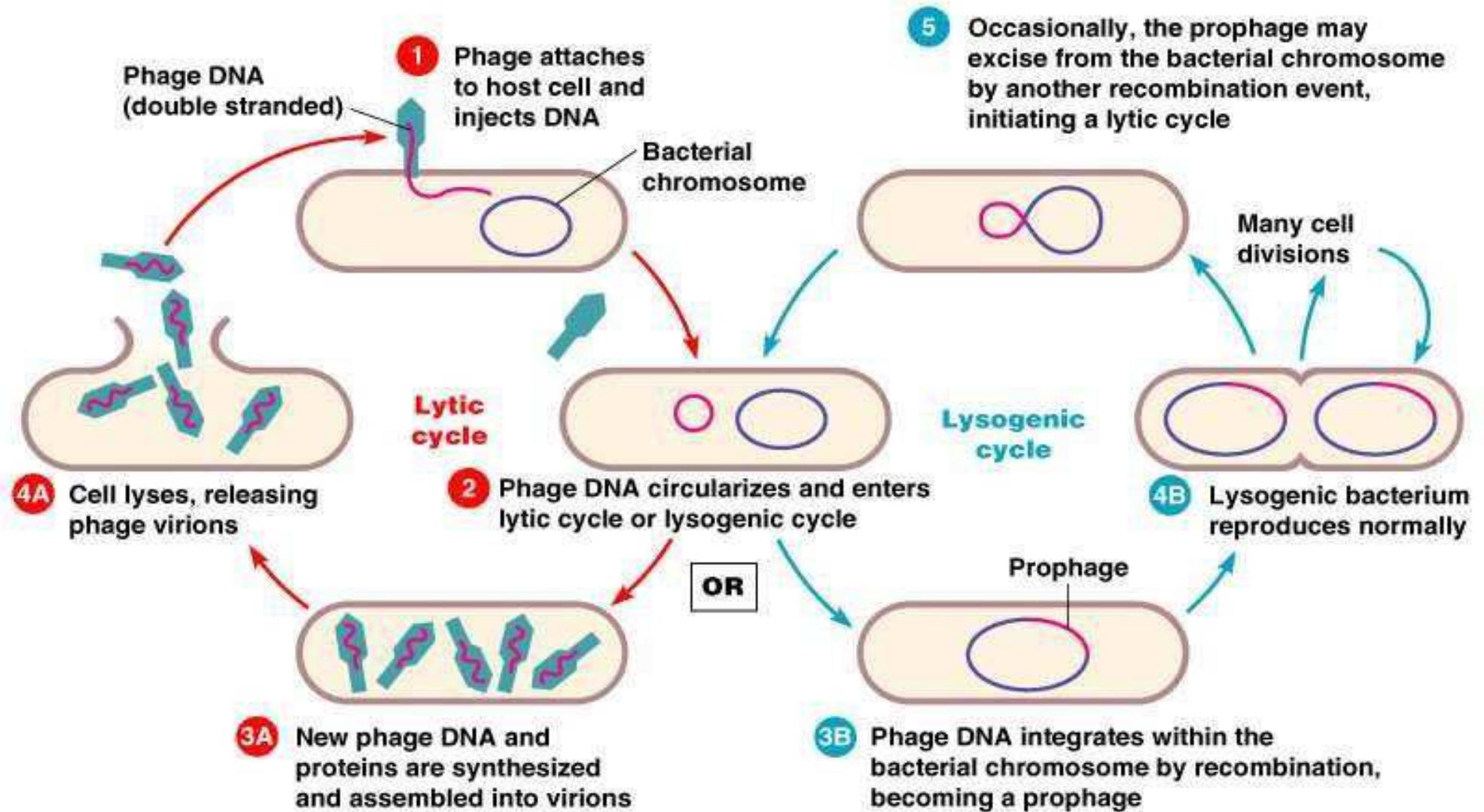
Phages: Virus pour bactérie

Le bactériophage lambda est un virus d'*E. coli*

Le phage lambda possède au niveau de sa tête un génome de sous forme d'ADN **double brin linéaire de 48,5kb**

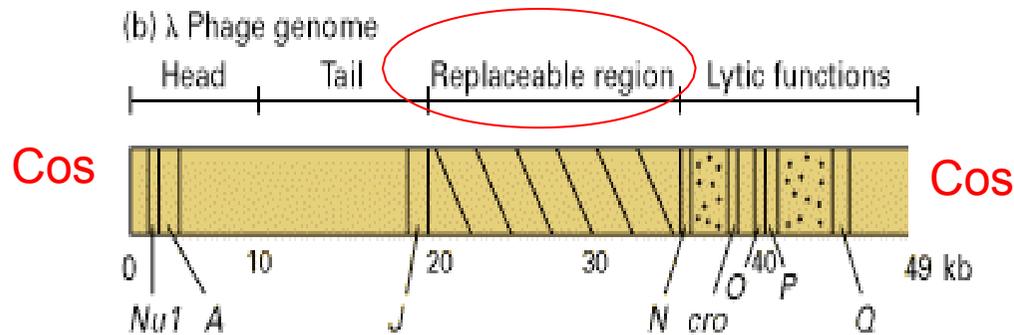


Le bactériophage lambda



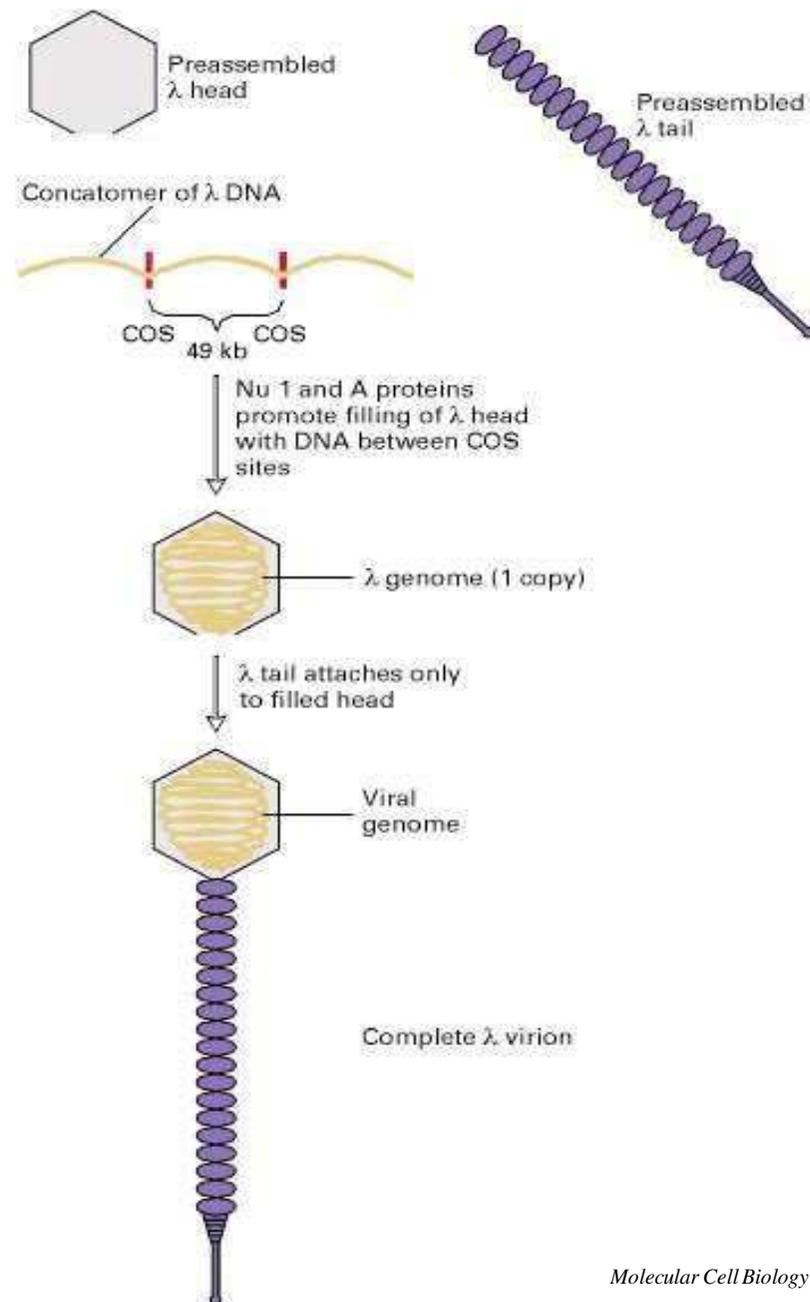
Les phages comme vecteurs de clonage

Phage = virus de bactéries

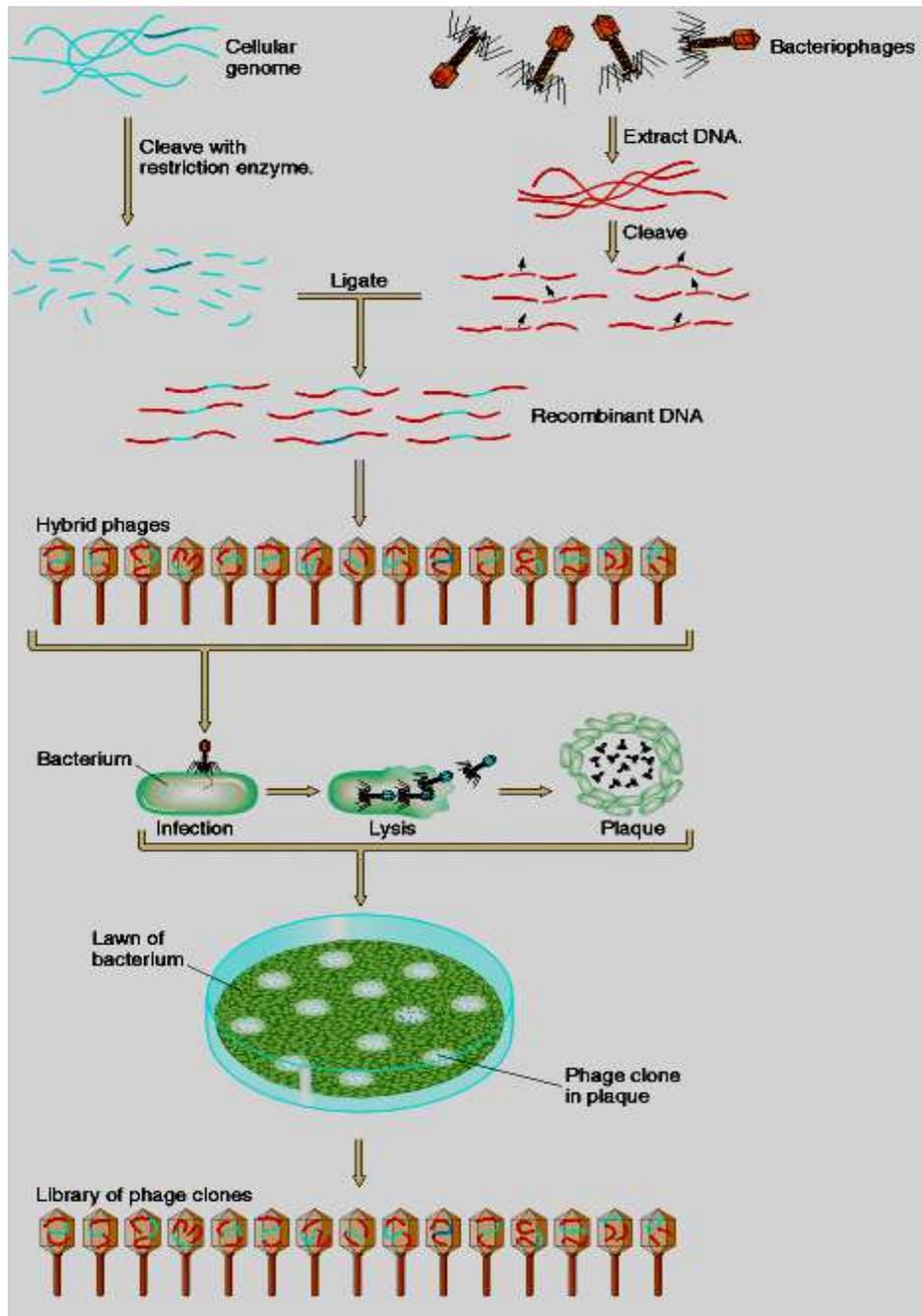


Les extrémités de cet ADN sont simples brins sur une longueur réduite, et complémentaires l'une de l'autre et surtout formant *des extrémités cohésives*.

Ces séquences sont appelées *séquences cos* (*pour cohésives*).



Les phages comme vecteurs de clonage

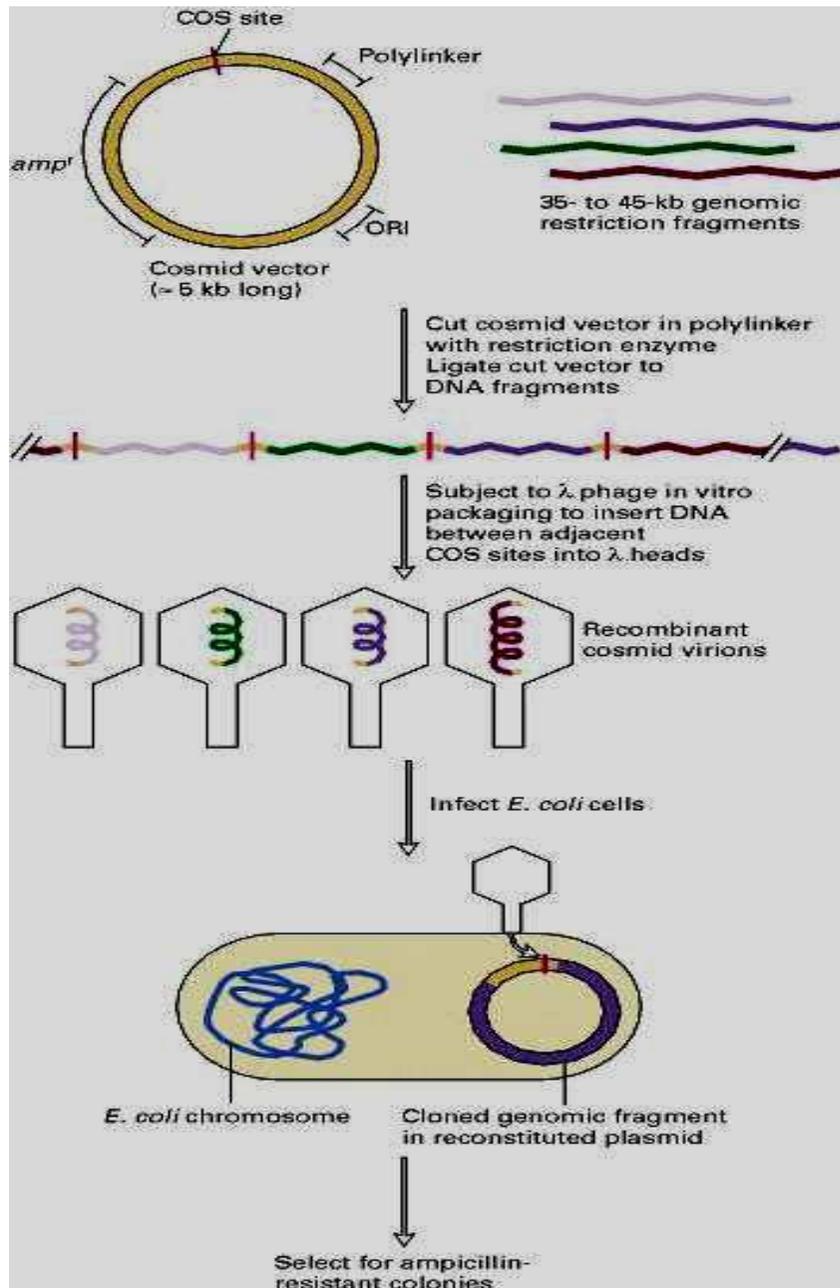


Préparation de l'ADN phagique : Destruction des protéines de capside et extraction de l'ADN

Encapsidation *in vitro* ou packaging de manière à produire des particules phagiques infectieuses

Ici on a cloné l'ADN dans le but de multiplier la séquence (notion de banque d'ADN voir prochain cours)

Les cosmides comme vecteurs de clonage



- Les cosmides sont des plasmides dans lesquels a été inséré le site **cos** du phage lambda. Le site cos rend possible l'empaquetage (in vitro) du plasmide dans la tête du phage lambda.

- Les cosmides sont coupés en un site de restriction unique par l'action d'une enzyme de restriction

- On mélange alors les molécules linéarisées avec les fragments d'ADN constituant l'insert coupés avec la même enzyme

- Cosmides et fragments s'unissent au hasard et, dans certains cas, un fragment sera flanqué de deux cosmides

- Un clivage enzymatique aux sites cos crée des bouts collants et, en présence des composants du phage, l'empaquetage des molécules recombinantes s'effectue.

- Après addition de la queue, la particule peut injecter son ADN recombinant dans une bactérie (exactement comme un phage lambda ordinaire). L'ADN injecté se circularise, via les sites cos, et se réplique comme un plasmide.

- On sélectionne comme pour un plasmide

Les YACs comme vecteurs de clonage

