République Algérienne Démocratique et Populaire
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

COURS 5:

CLONAGE ET VECTEURS DE CLONAGE

Dr ABDI Meriem
Génie génétique, Licence 3 Biochimie

CLONAGE MOLECULAIRE

- **Le clonage moléculaire** consiste à l'insertion d'une séquence d'ADN dénommé **insert** dans un **vecteur** approprié puis son introduction dans une **cellule-hôte** afin d'en obtenir plusieurs copies.
- **Le clonage moléculaire** est différent du **clonage reproductif** (créer un individu génétiquement identiques) ou du **clonage thérapeutique** (créer des tissus à partir de cellules souches pour effectuer des greffes compatibles avec le receveur).

CLONAGE MOLECULAIRE

- consiste à isoler un fragment d’ADN et à le multiplier à l’identique.
- Le fragment d’ADN est au préalable introduit dans une construction que l’on appelle vecteur.
- Le vecteur recombiné (vecteur+insert) est ensuite introduit dans une cellule hôte.

ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES

1. Un Vecteur

Circulaire
Linéaire

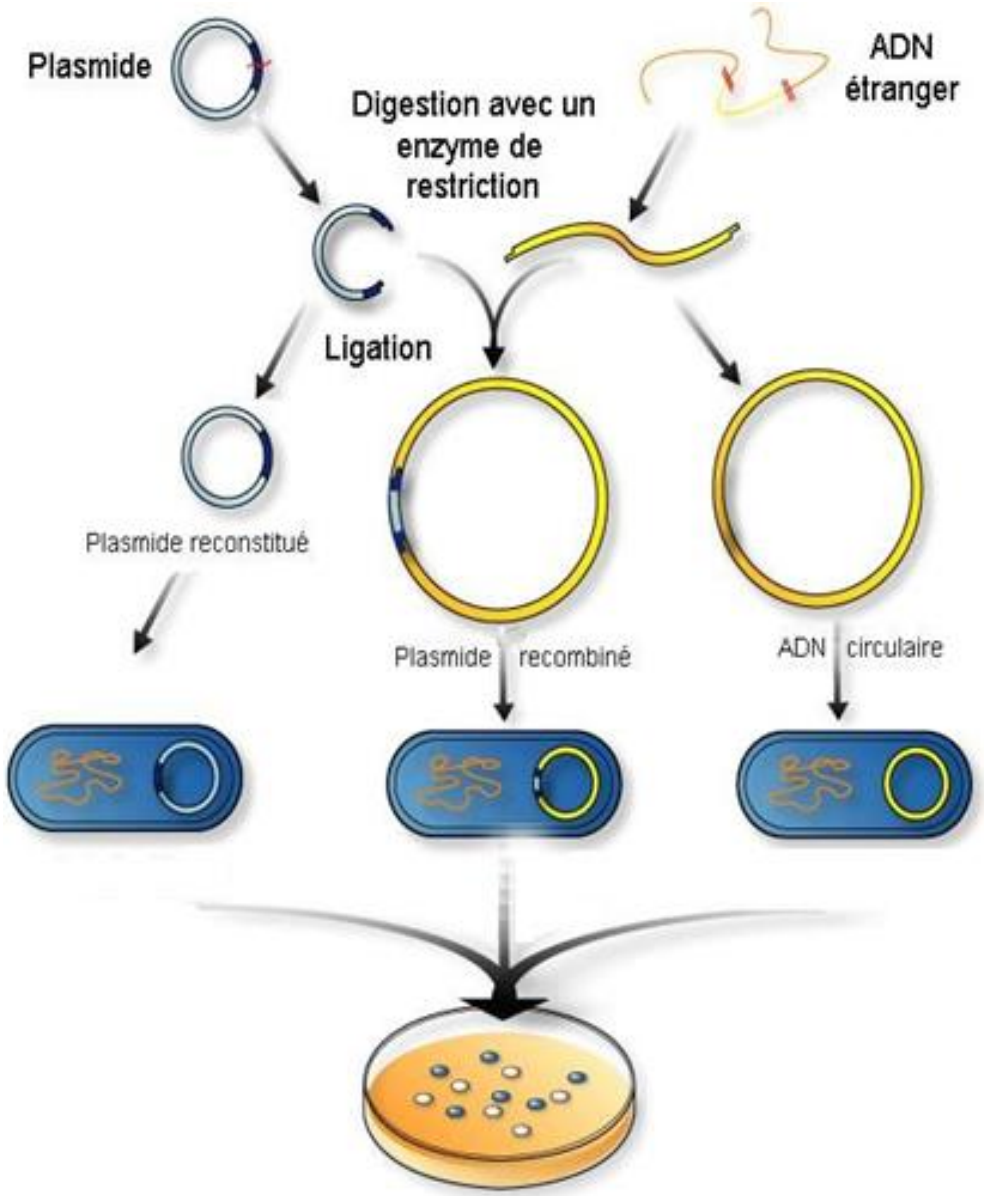
2. Une Cellule hôte

Procaryote
Eucaryote

3. Un fragment d'ADN

ADN génomique
ADN complémentaire

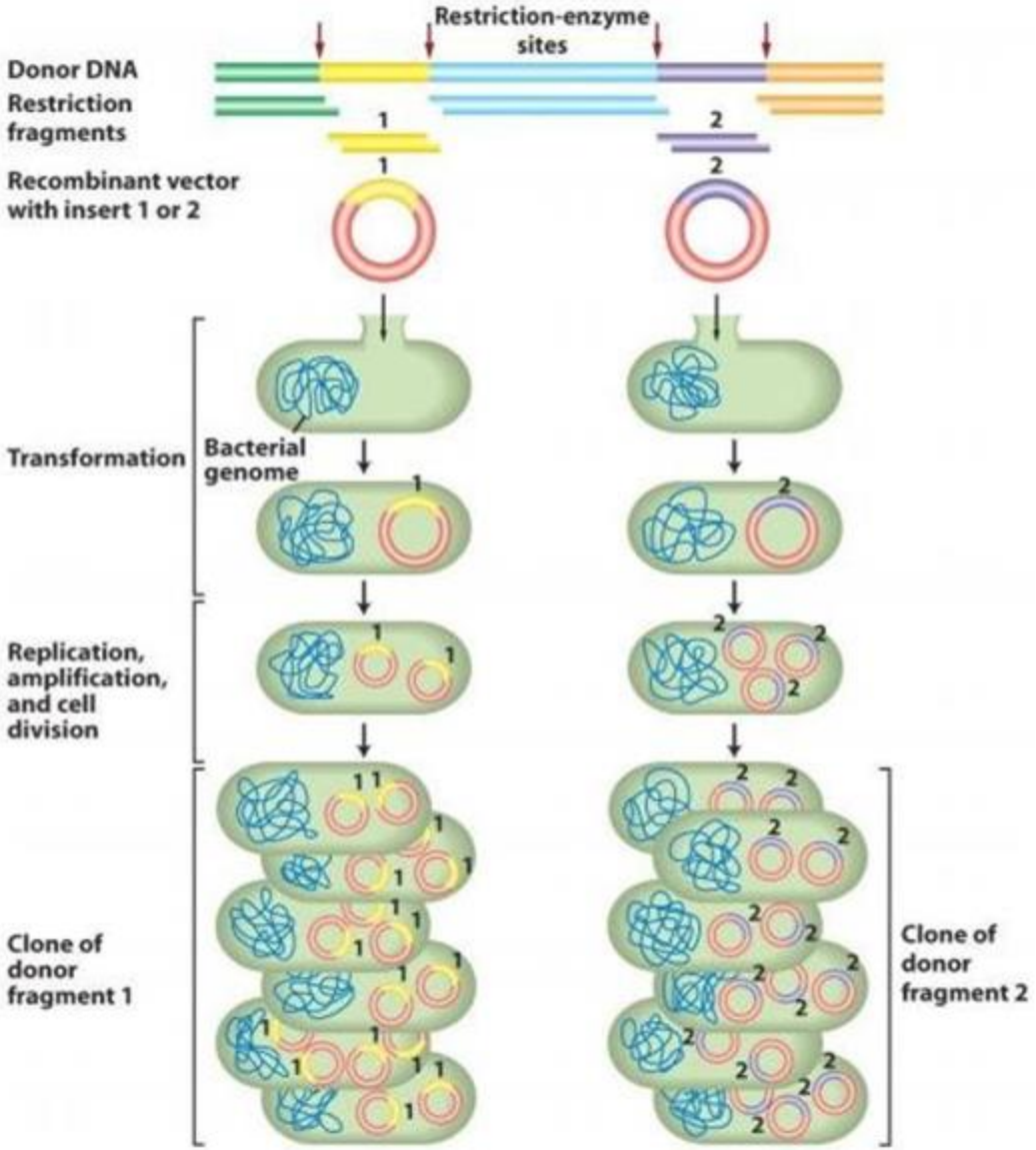
CLONAGE MOLECULAIRE



CLONAGE MOLECULAIRE

- Les organismes hôtes les plus utilisé sont Escherichia coli ou la levure Saccharomyces cerevisiae.
- Capacités de multiplication et une grande vitesse de prolifération ⟶ reproduire à l'identique un très grand nombre de copies de l'insert.
- **Exemple:** Escherichia coli se divise toutes les 20 minutes. Au bout de seulement 10 heures, on obtient à partir d'une seule bactérie, un milliard de bactéries portant chacune une ou plusieurs copies du vecteur recombiné.

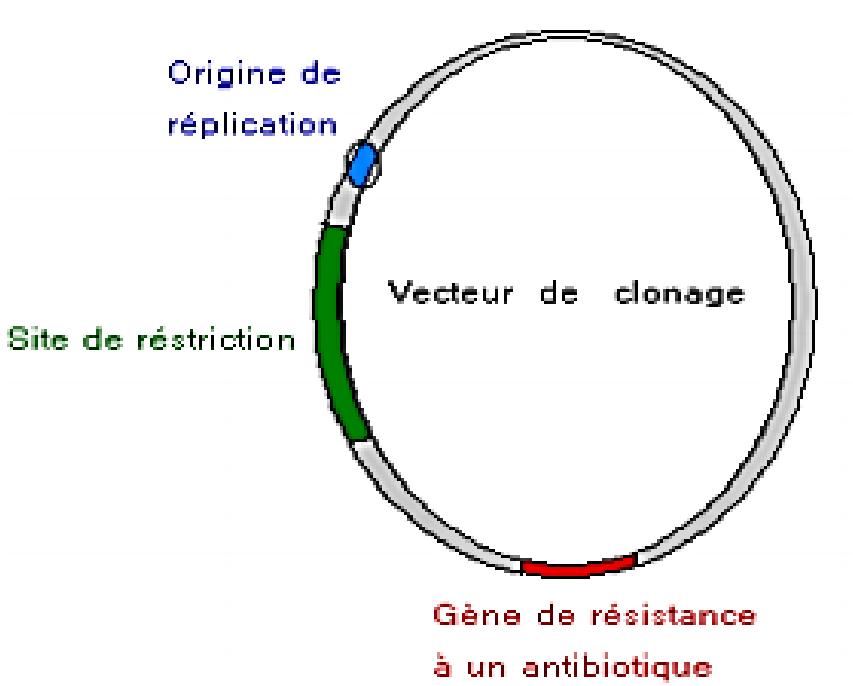
CLONAGE MOLECULAIRE

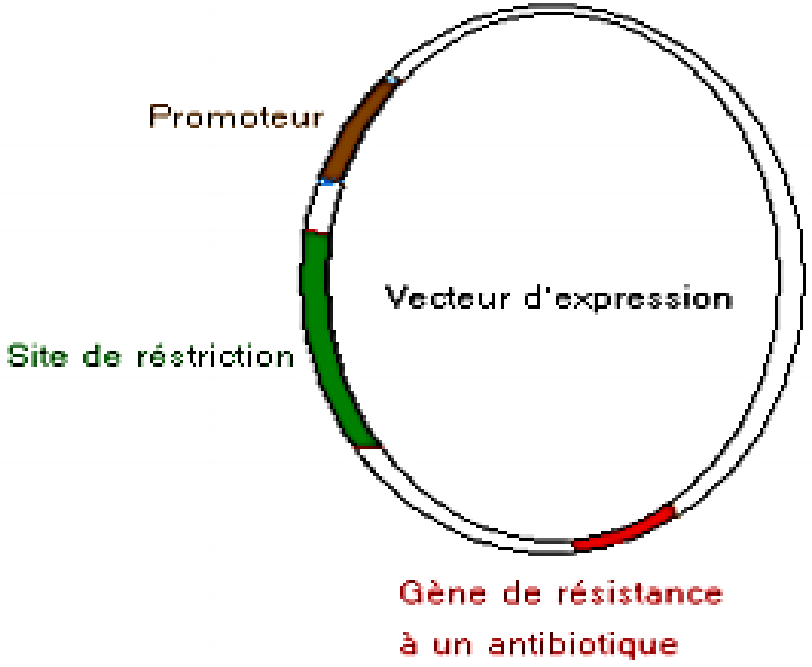


CATEGORIES DE VECTEURS

1.Vecteur de clonage : renferme une origine de réplication et permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.

2.Vecteur d'expression : Renferme un promoteur et permet de faire exprimer un gène.





VECTEUR DE CLONAGE

- C’est un système permettant le transfert, l’expression et la réplication d’un ADN étranger dans les cellules hôtes en vue d’un clonage moléculaire.
- Couramment utilisés en vue de production de protéine recombinantes, pour le séquençage d’un gène, pour la sélection d’un gène dans une banque d’ADN, etc.

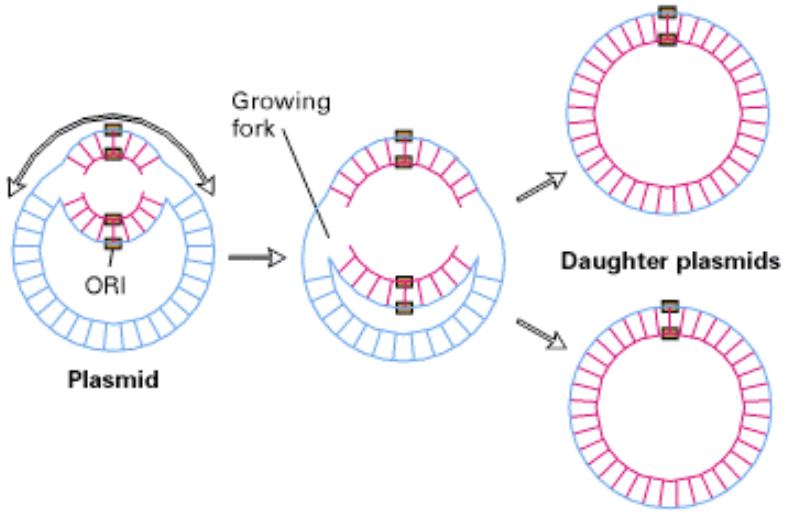
CHOIX DU VECTEUR DE CLONAGE

- Le choix d’un vecteur de clonage dépend de :

1. La taille et compatibilité des extrémités de l’ADN étranger à insérer
2. L’application du clonage: cartographie et séquençage de génome, expression de protéine thérapeutique dans une bactérie, thérapie génique.

PROPRIÉTÉS DES VECTEURS DE CLONAGE

1. Réplication autonome et indépendante de l'ADN de la cellule hôte.

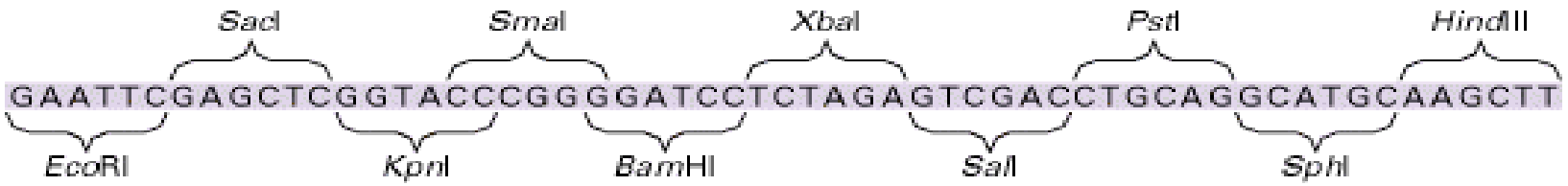


2. Petite taille: pour permettre l'insertion de grand fragment d'ADN étranger

3. Présence de gènes de sélection: sélection des cellules hôtes qui ont intégré un vecteur.

PROPRIÉTÉS DES VECTEURS DE CLONAGE

4. Présence de sites de restriction localisés dans les gènes de sélection: permet de sélectionner les cellules hôtes qui ont intégré un vecteur recombinant.



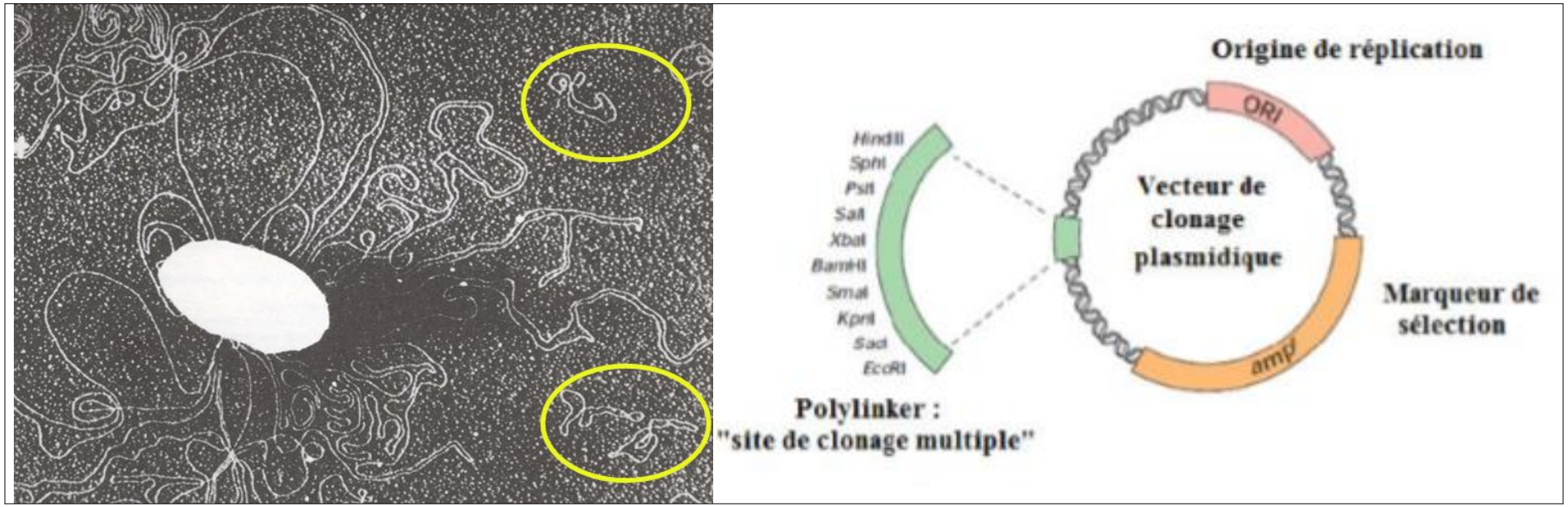
5. Stabilité: maintient sans modification dans la cellule hôte, quel que soit le nombre de division.

EXEMPLES DE VECTEUR DE CLONAGE

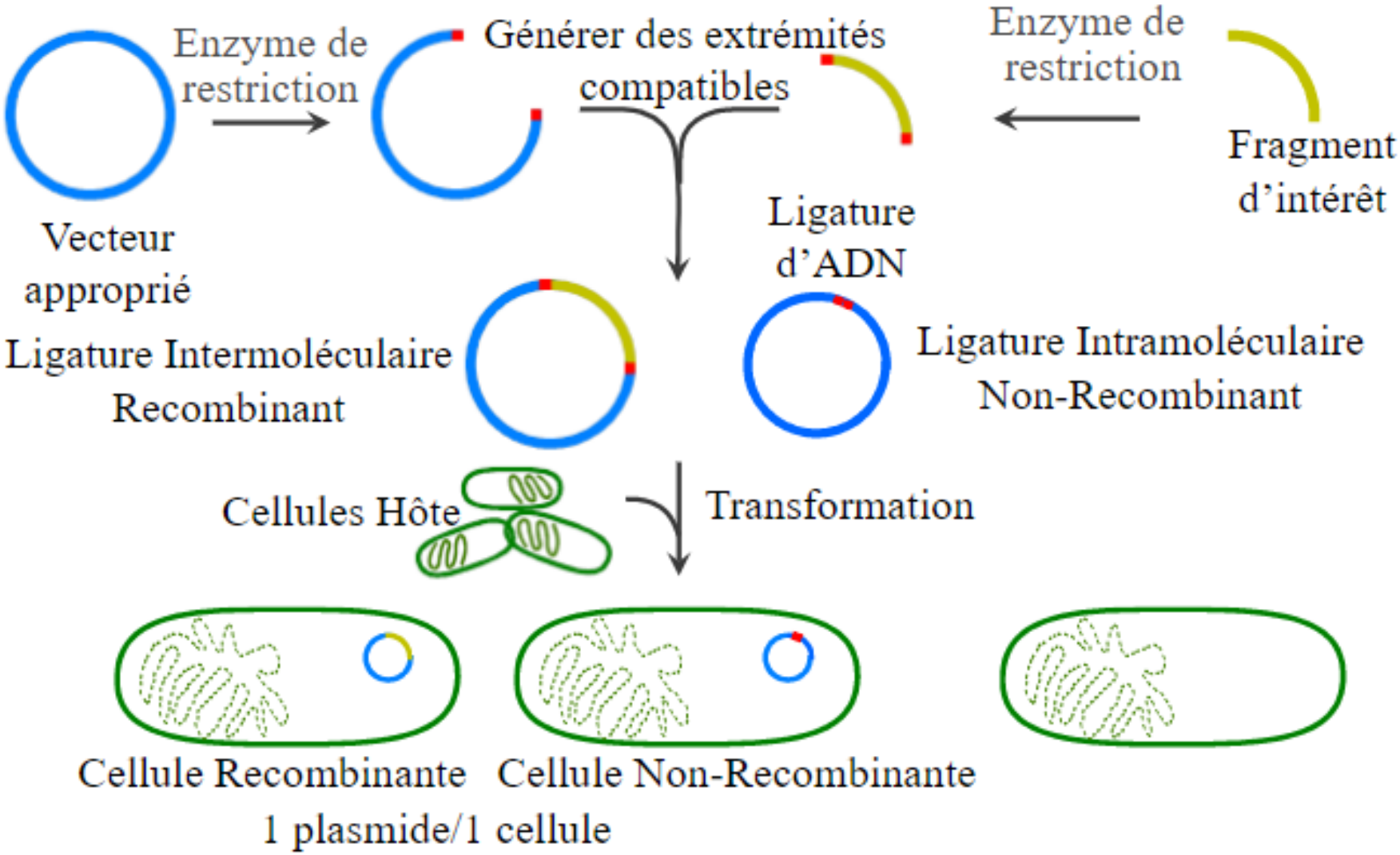
VECTEURS	HOTE	INSERT (Kb)
1.Plasmides	Bactérie	10
2.Phage lambda	Bactérie	25
3. Cosmide	Bactérie	45
4.YAC (yeast artificial chromosome)	Levure	1000
5.BAC (bacterial artificial chromosome)	Bactérie	300

1. LES PLASMIDES

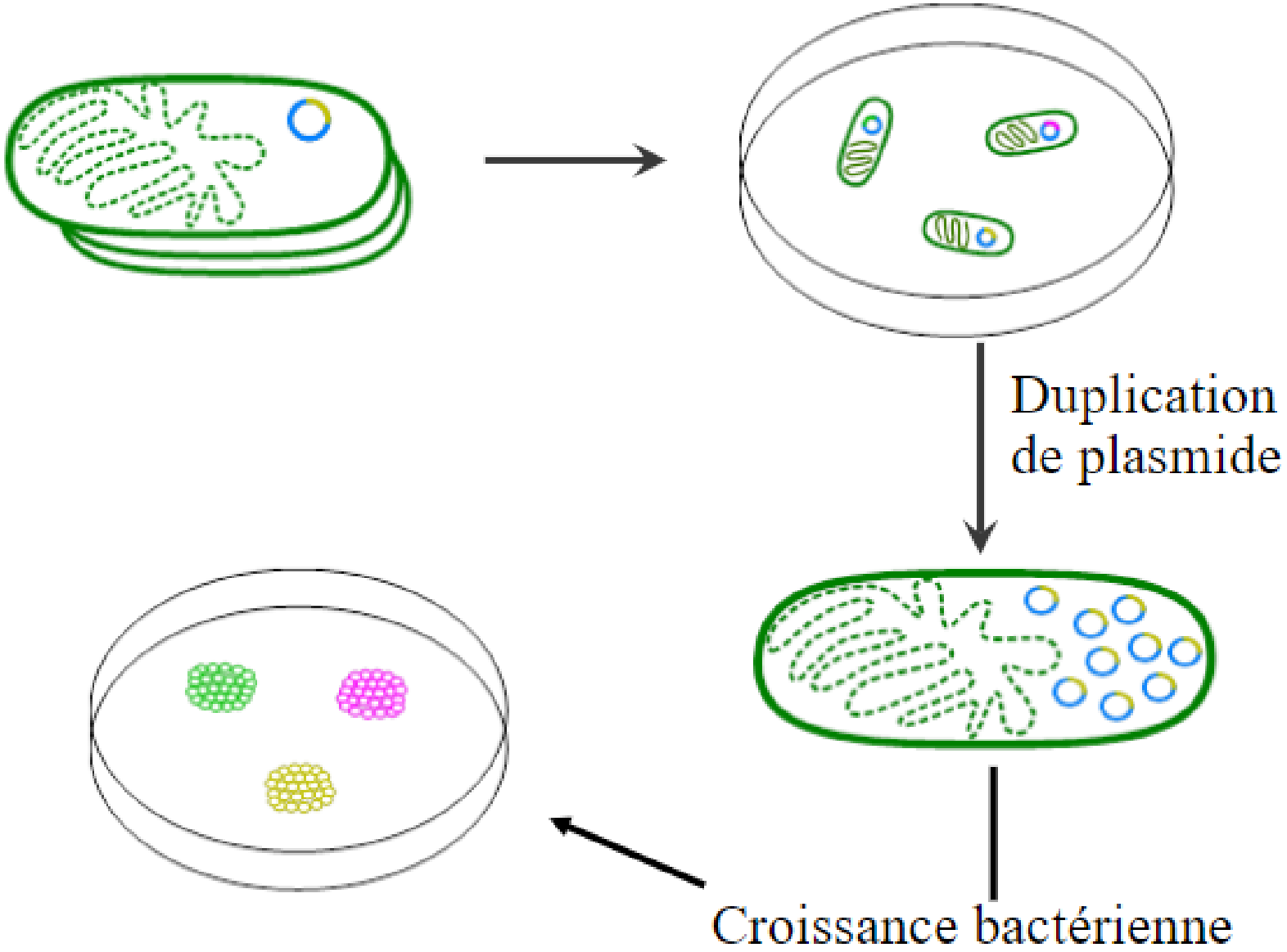
- Molécule d'ADN d'origine bactérienne
- Molécule d'ADN double brin circulaire de taille réduite : 2 à 5kb
- Capable d'intégrer jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques pour permettre la sélection



1. LES PLASMIDES



1. LES PLASMIDES



LES PLASMIDES

- Les premiers utilisés en génie génétique.
- Ce sont des plasmides à l’état naturel, non modifiés au laboratoire.
- Il s’agit des plasmides suivants :

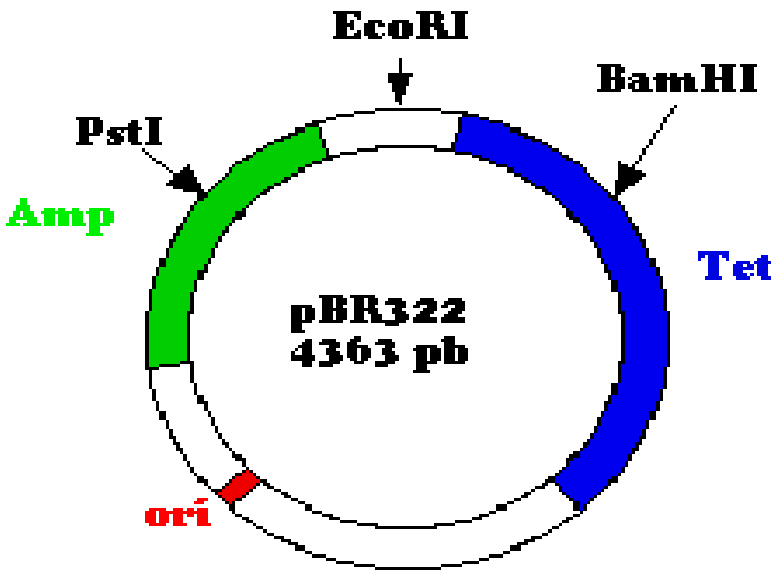
ColE1

RSF 2124

pSC 101

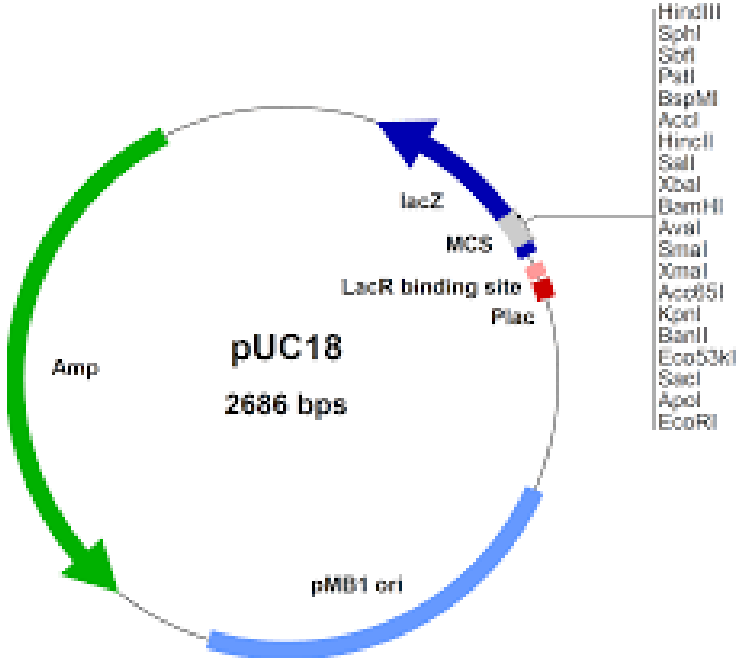
LES PLASMIDES pBR

- Des plasmides artificiels.
- La série la plus importante de ces plasmides est la série pBR 312 à pBR 322.
- Le plasmide pBR322 est constitué d'environ 4,4 Kb.
- Possède deux gènes de résistance à la tétracycline et à l'amplicilline.
- Il possède 20 sites de restriction uniques dont 11 localisés sur les deux gènes de résistance.



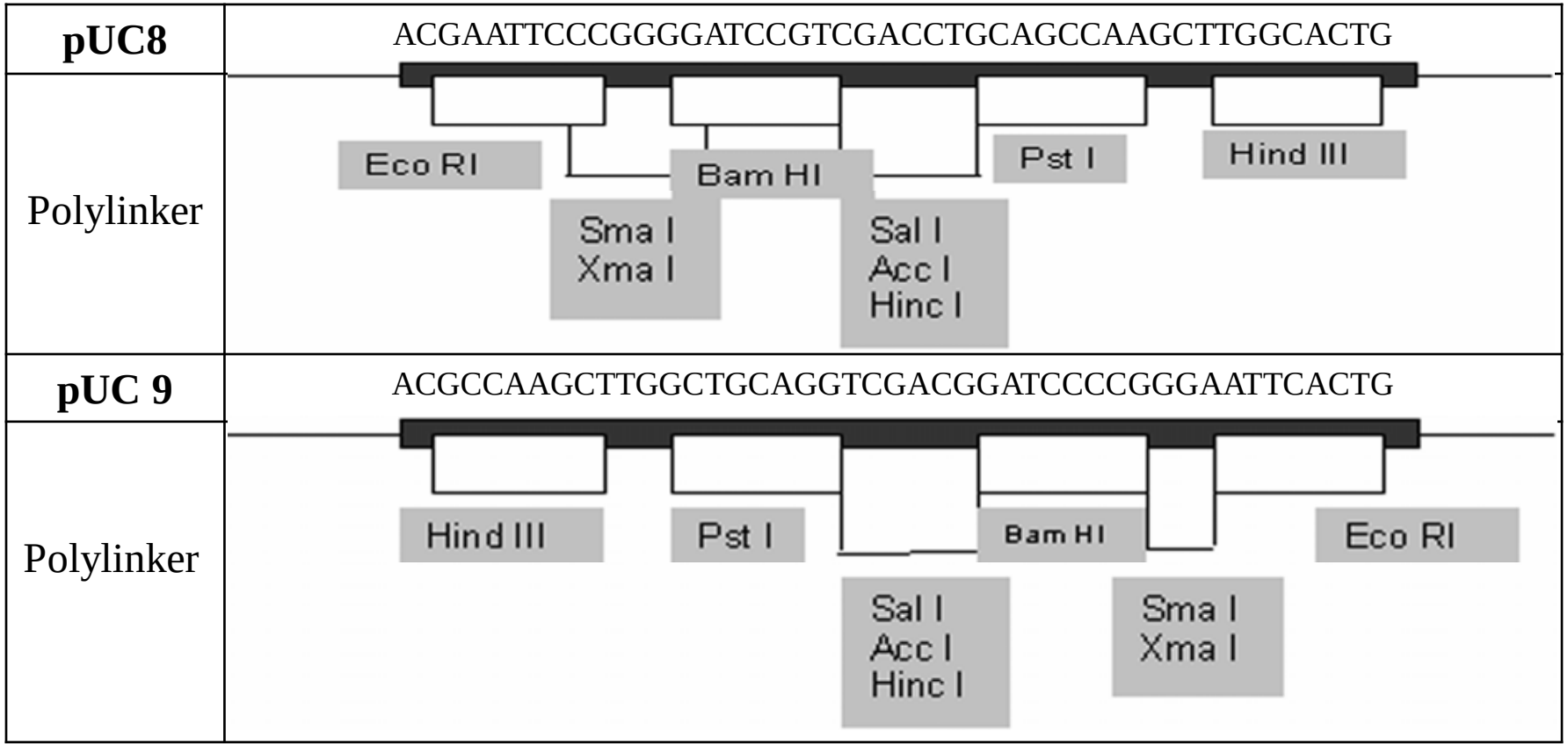
LES PLASMIDES pUC

- Des plasmides artificiels : la famille des pUC de pUC8 à 19.
- Ont une taille qui avoisine 2,6 Kb.
- Un plasmide pUC est un plasmide pBR dans lequel on a remplacé le gène de résistance à la tétracycline par un gène bactérien lacZ qui code la galactosidase.
- Un polylinker identique à celui du phage M13 est associé à lacZ.

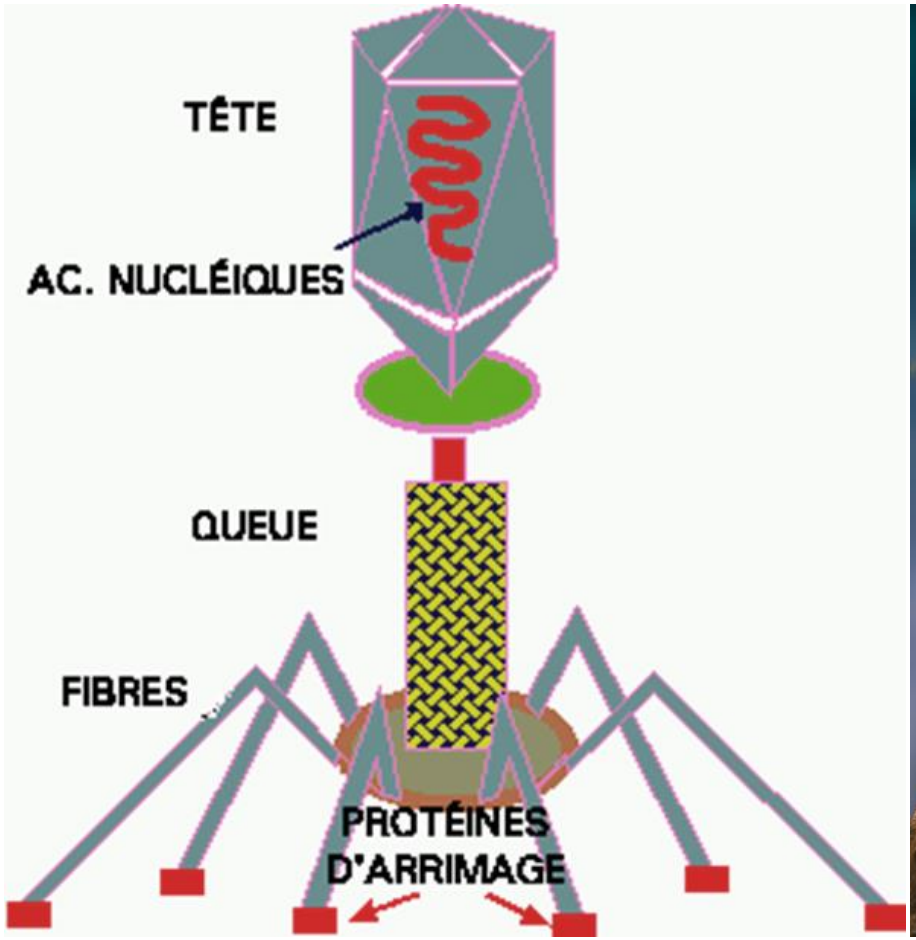


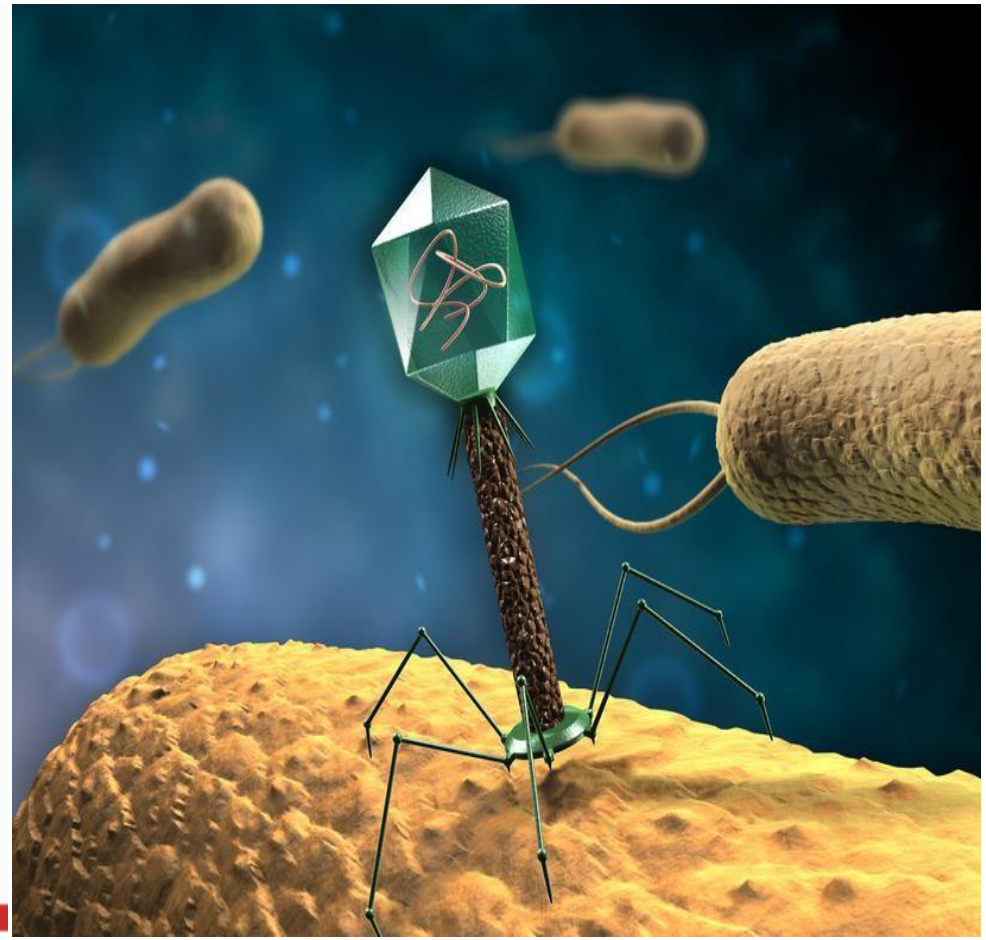
LES PLASMIDE pUC

- Les pUC (pUC8 à pUC19) ne différent que par le nombre de nucléotides et par l'emplacement du polylinker.



2.LES PHAGES





2.LES PHAGES

- Les phages sont des virus qui infectent les bactéries.
- Deux phages sont très utilisés comme vecteurs: le phage lamba et le phage M13.
- Le phage lambda (Enterobacteria phage λ) est un virus bactériophage qui infecte la bactérie *Escherichia coli*. Ce bactériophage est un virus à ADN double brin.
- Le bactériophage M. 13 est un phage dont la forme libre est constituée d'une membrane entourant un ADN simple brin de 6,4 kb.

PHAGES λ

- Découvert par E.M. Lederberg en 1950.

- Deux parties sont individualisées dans le phage lamba:

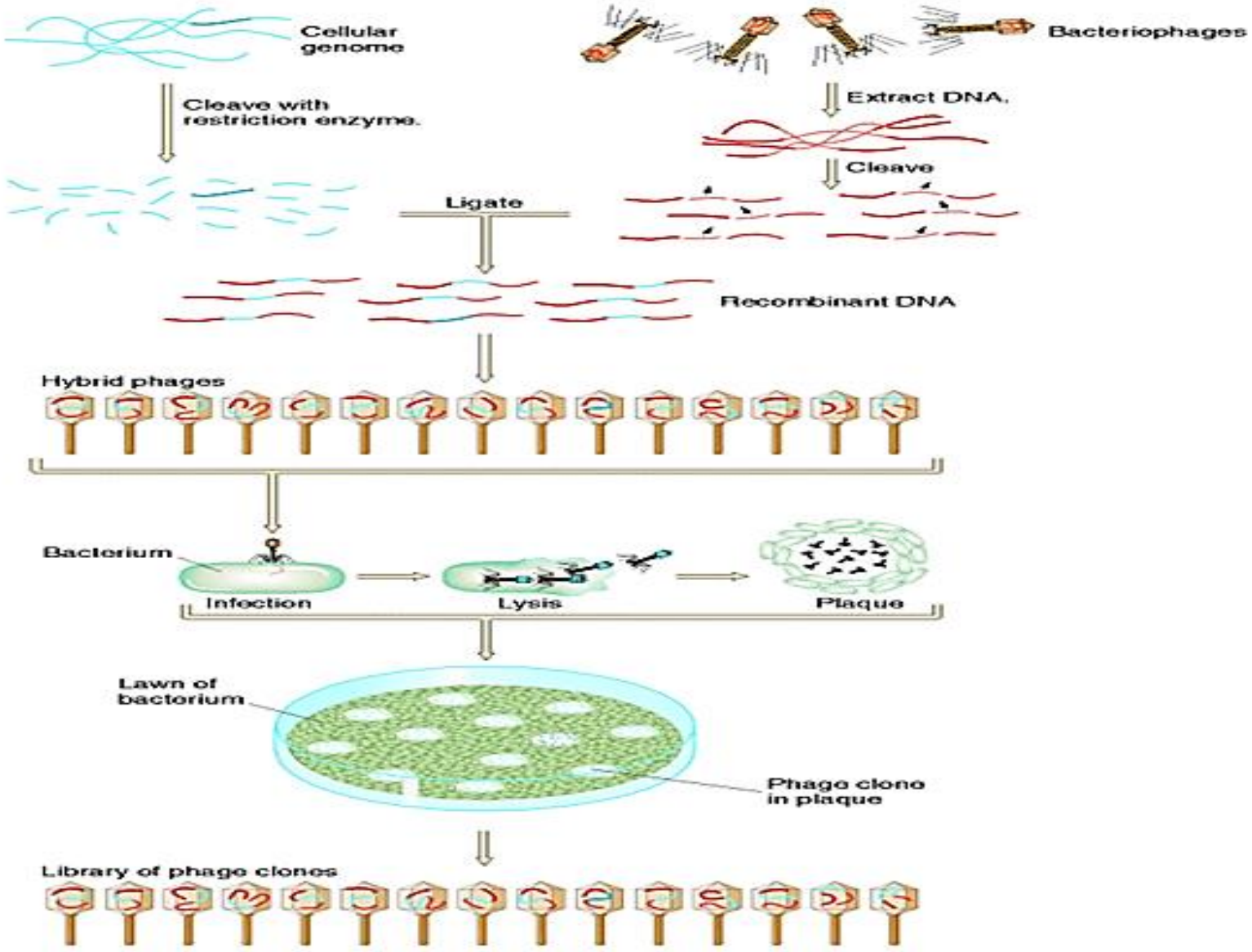
1. La tête du virus: Elle renferme l'ADN viral (ADN double brin de 48 kb).

2. La queue du virus: Elle permet la fixation du virus sur la cellule hôte bactérienne.

- A chaque extrémité 5' de l'ADN se trouve une région monocaténaire de 12 nucléotides l'une complémentaire à l'autre.

- Leurs association donne une structure circulaire à l'ADN dans la cellule hôte.

PHAGES λ


Cellular genome
Bacteriophages
Cleave with restriction enzyme.
Extract DNA.
Cleave
Ligate
Recombinant DNA
Hybrid phages
Bacterium
Infection
Lysis
Plaque
Lawn of bacterium
Phage clone in plaque
Library of phage clones

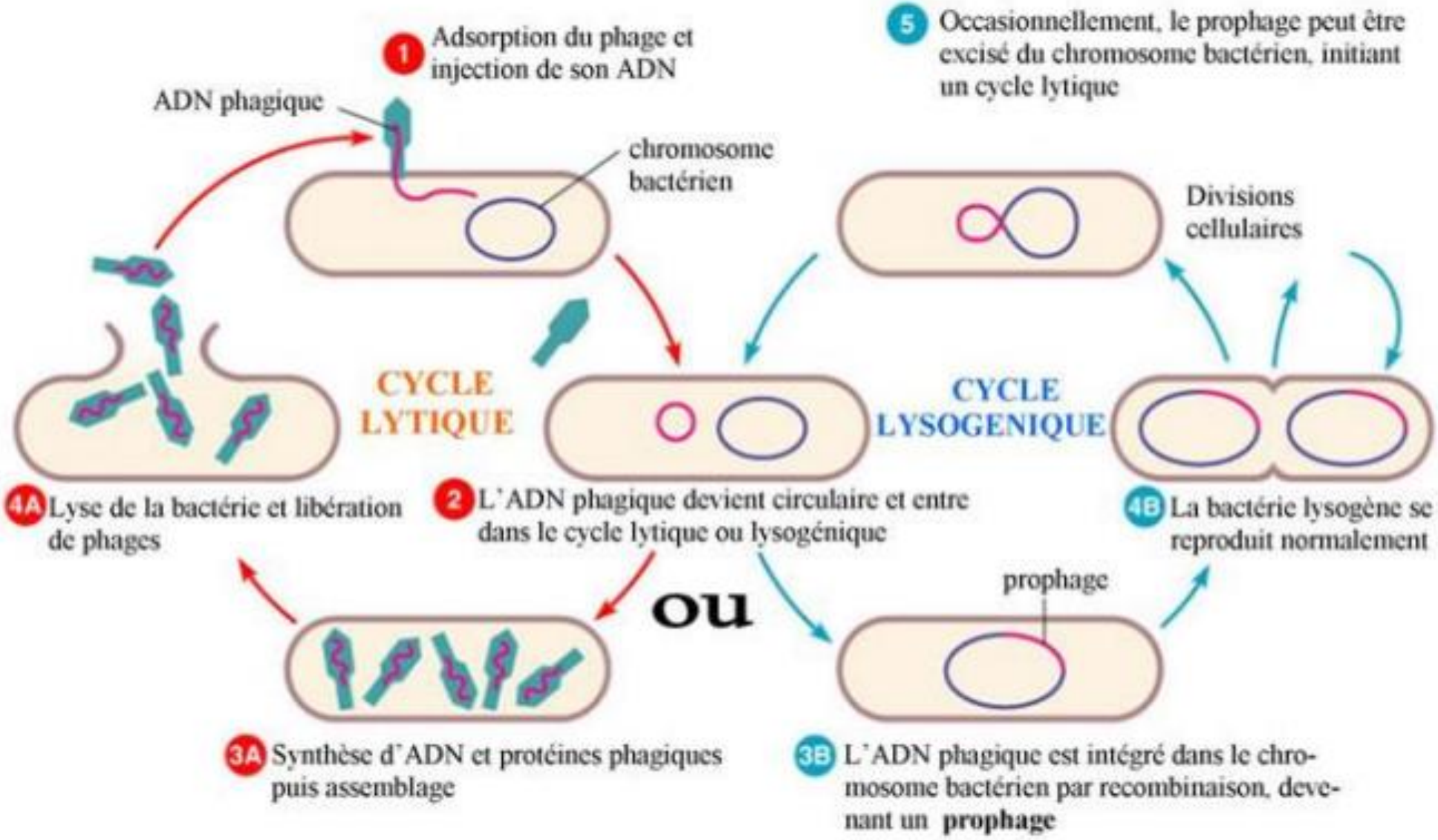
PHAGES λ

- L’ADN intégré se recombine avec le chromosome bactérien.
- L'intégration peut ensuite entraîner soit une réponse lysogénique, soit une réponse lytique.
- Lorsque la réponse lysogénique se produit, les gènes viraux responsables de la réplication virale ne sont pas exprimés. L’ADN viral est alors qualifié de prophage. La bactérie continue de se reproduire par scissiparité est dite *lysogène*.
- Une réponse lysogénique n’a pas toujours de conséquence sur la vie de la cellule.

PHAGES λ

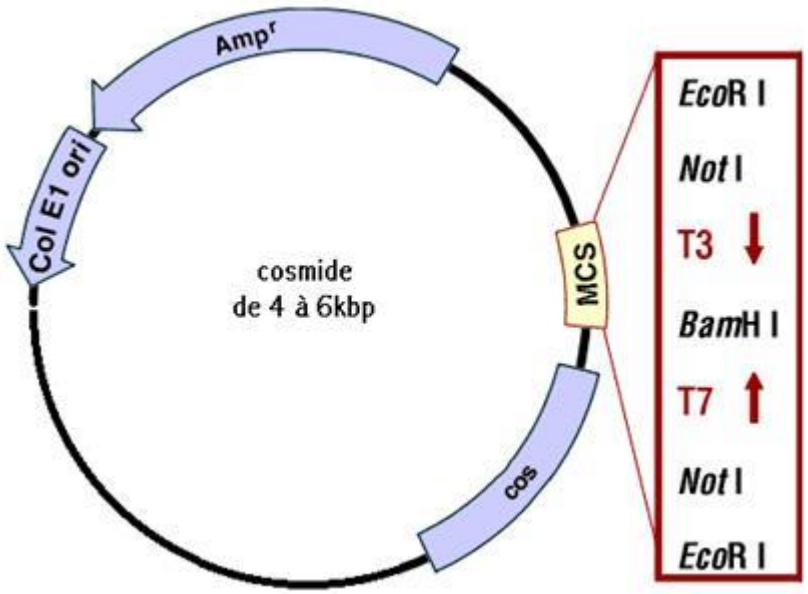
- Sous l’effet d’un stress, la réponse lysogénique peut devenir lytique.
- La réponse lytique consiste en la production d’un grand nombre de phages, et ensuite à l’éclatement de la bactérie infectée.

PHAGES λ

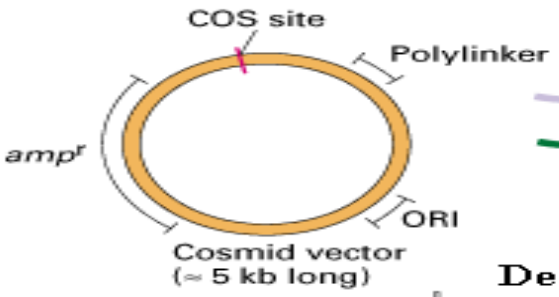

1 Adsorption du phage et injection de son ADN
ADN phagique
chromosome bactérien
5 Occasionnellement, le prophage peut être excisé du chromosome bactérien, initiant un cycle lytique
Divisions cellulaires
CYCLE LYTIQUE
CYCLE LYSOGENIQUE
4A Lyse de la bactérie et libération de phages
2 L'ADN phagique devient circulaire et entre dans le cycle lytique ou lysogénique
4B La bactérie lysogène se reproduit normalement
ou
prophage
3A Synthèse d'ADN et protéines phagiques puis assemblage
3B L'ADN phagique est intégré dans le chromosome bactérien par recombinaison, devenant un prophage

COSMIDE

- Le cosmide est un vecteur artificiel hybride : phage lambda-plasmide.
- Il se comporte comme un plasmide avec des sites de restriction permettant l'insertion d'ADN étranger et un gène de résistance aux antibiotiques (ampicilline).
- De plus, un site cos d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.
- Intègre environ 40 kb d'ADN étranger.



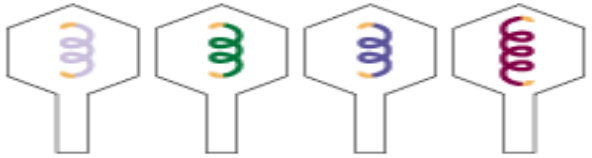
COSMIDE



Fragments d'ADN génomique de 35 à 45kbp.

Des concaténats de l'ADN du cosmide sont coupés dans le polylinker par une enzyme de restriction.
On religue les ADN cosmidiques avec des fragments d'ADN étranger.

On mélange l'ADN recombiné avec un mélange d'assemblage in vitro de lambda pour que l'ADN compris entre deux sites cos entre dans une tête.



On obtient des bactériophages recombinés

Ces phages infectent des cellules d'E. coli.

chromosome bactérien

fragment génomique cloné dans le cosmide

sélection de clones AmpR

COSMIDE: ETAPE D’EMCOMPAQUETAGE 1

1. Les sites cos rendent possible l’empaquetage in vitro du plasmide porteur d’un insert dans la tête du phage lambda.

2. Les cosmides sont coupés en un site de restriction unique par l’action d’une enzyme de restriction.

3. On mélange les molécules linéarisées avec les fragments d’ADN constituant l’insert coupés avec la même enzyme.

COSMIDE: ETAPE D’EMCOMPAQUETAGE 2

4. Les cosmides et les fragments s’unissent au hasard.

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

6. Après l’addition de la queue, la particule peut injecter son ADN recombinant dans une bactérie. L’ADN injecté se circularise, via les sites cos, et se réplique comme un plasmide. On peut détecter sa présence dans la cellule, par l’expression de gènes de résistance à des antibiotiques, codés par le plasmide.

YAC

- Chromosome artificiel construit in vitro
- Peut porter des inserts allant jusqu'à 2 000 kb.
- Contient les parties du chromosome de la levure nécessaires à sa réplication et à sa ségrégation dans la cellule hôte : levure.
- Capable de véhiculer de grands gènes eucaryotes avec promoteur et séquences régulatrices.

YAC

- Un vecteur YAC contient :

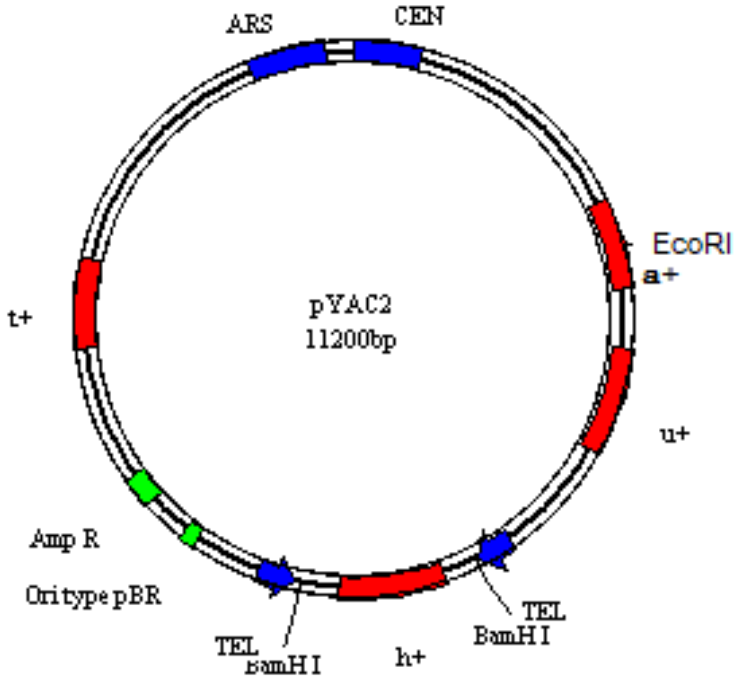
1- Un centromères (CEN) et deux télomères (TEL)

2- Une séquence de réplication autonome (ARS) pour la prolifération dans les cellules hôtes

3- Des sites de restriction SmaI et Bam HI

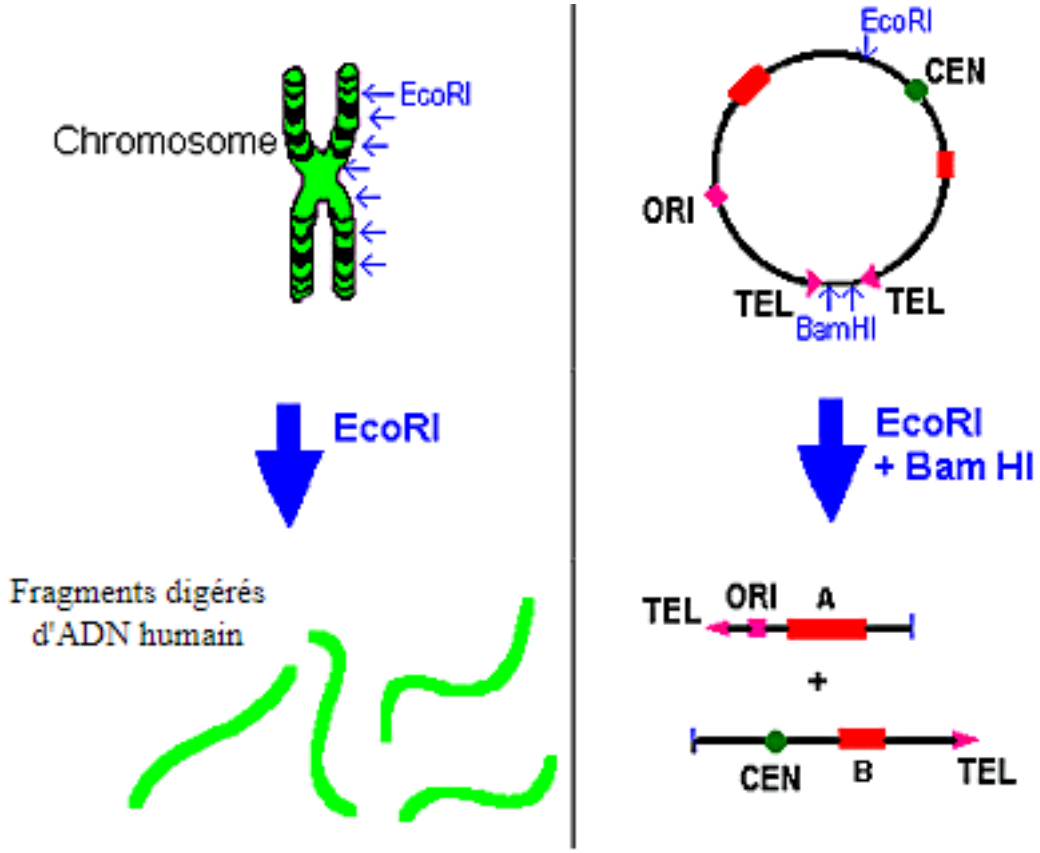
4-Un marqueur de sélection à l’ampicilline (Amp R)

5-Des gènes qui codent des enzymes nécessaires dans la synthèse d'acides aminés: u+ (Ura), t+ (Trp), h+ (His) et a+ (Ade).



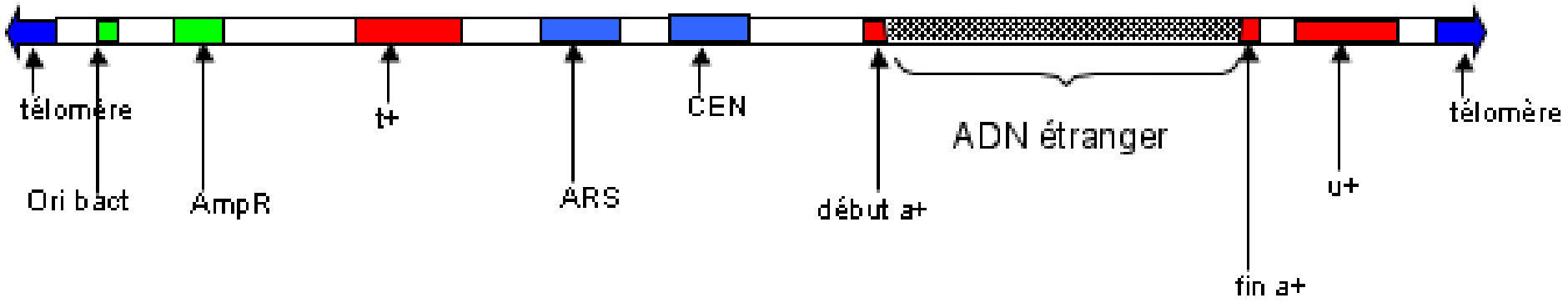
CLONAGE DANS UN VECYEUR YAC

- Une digestion par BamHI et EcoRI libère trois fragments : l'un contient h+, ARS et CEN ainsi qu'un télomère, le second contient u+ et un télomère et le troisième uniquement h+.
- Ces fragments de tailles différentes peuvent être séparer par électrophorèse sur gel d'agarose



CLONAGE DANS UN VECYEUR YAC

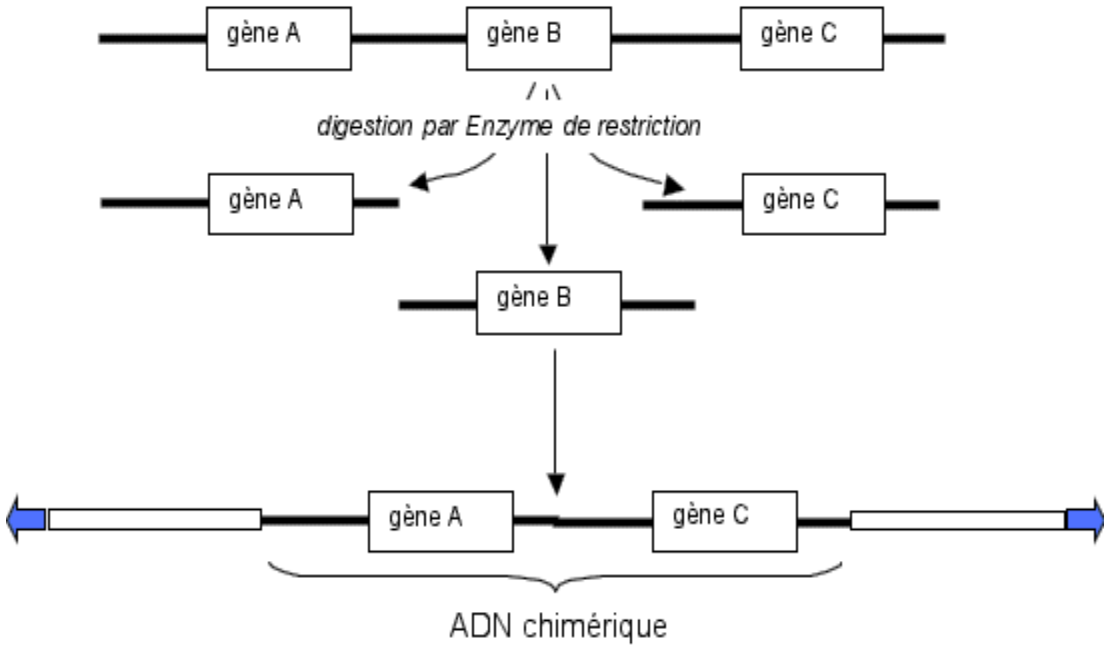
- Les deux gros fragments sont mélangé avec les fragments d'ADN à insérer ayant des extrémités cohésives compatibles.
- Après action de la ligase on obtient un minichromosome recombiné qui possède deux télomère, un centromère, la séquence ARS, Amp R et t+ et u+.



BAC

- Le projet de séquençage du génome humain a commencé à l'aide des YAC mais pour éviter les problèmes d'ADN chimérique, les BAC ont peu à peu remplacé les YAC qui ne sont actuellement presque plus utilisés.

- Les BAC sont des ADN circulaires, comme un chromosome bactérien, dont l'origine de réplication est issue de l'épisome sexuel F d'E. coli (plasmide impliqué dans la conjugaison bactérienne).



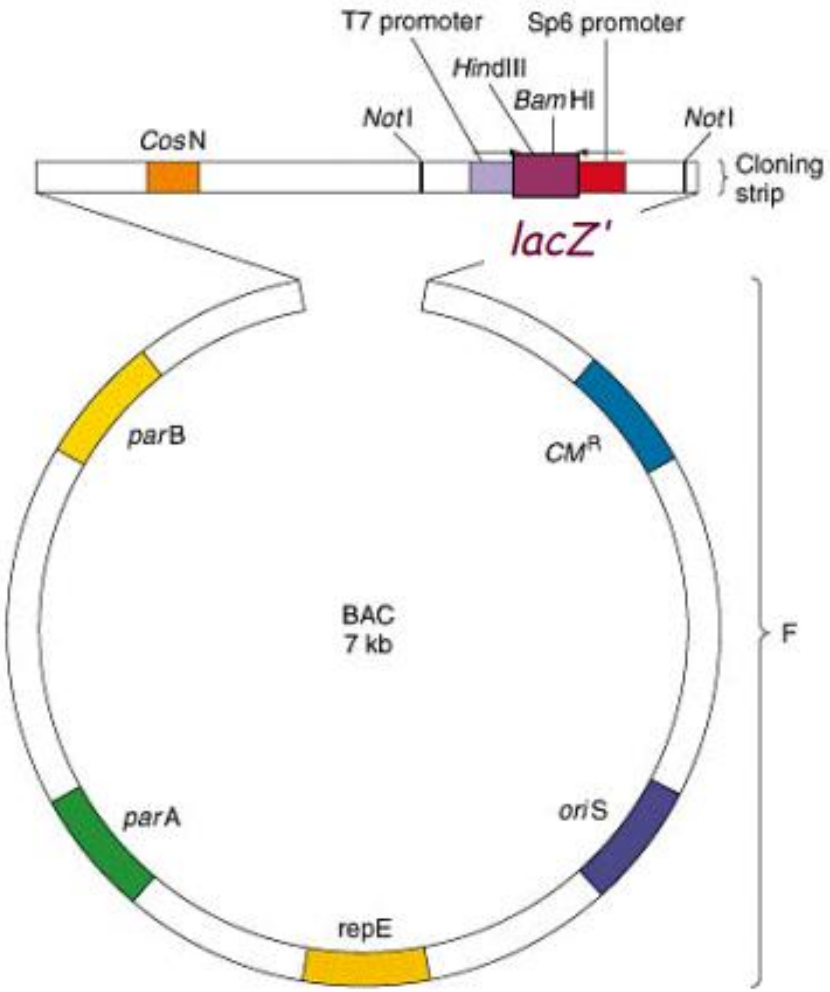
BAC

- Le vecteur Bac contient:

1- Ori S: origine de réplication de l'épisome F.

2- Les gènes par B et par A de l'épisome servent à la répartition correcte du plasmide dans les cellules filles.

3- Le gène repE code l'enzyme de réplication de l'épisome.

4- Site de clonage dans le gène lacZ': crible de sélection blanc/bleu

5- CmR d'origine plasmidique code la résistance au chloramphénicol.