

BIOLOGIE MOLECULAIRE

CHAPITRE II: Les Vecteurs

I) Définition:

Petites molécules d'ADN possédant leur propre système de réplication. Ils servent de véhicule pour le clonage génique.

II) Les 2 catégories de vecteurs:

Vecteur de clonage: Destiné à isoler physiquement un fragment d'ADN et à amplifier le nombre de copies.

Vecteur d'expression: Destiné à transférer un gène et le faire exprimer dans une cellule hôte qui n'est pas sa cellule d'origine.

III) Caractéristiques des vecteurs:

1. réplication épisomale (facteur sexuel F):
réplication indépendante de l'ADN de la cellule hôte.
2. petite taille:
pour permettre l'insertion de grand fragment d'ADN étranger (vecteur recombinant qui doit être stable)
3. présence de gènes de sélection:
sélection des cellules hôtes qui ont intégré un vecteur.
4. présence de sites de restriction uniques 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 (en relation avec la 2.)

IV) Différents vecteurs de clonage:

1. Les plasmides:

a) Définition:

C'est une petite molécule d'ADN circulaire possédant son propre système de réplication. Il est présent chez les bactéries et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (« plasmide 2 μ »).

b) Caractéristiques des plasmides:

- Peuvent être présent en plusieurs centaines de copies au sein d'une même cellule bactérienne (cela dépend de la souche bactérienne).
- Présence de la séquence ORI (qui permet la réplication autonome)
- Petite taille: 2 à 5 kb (le chromosome d'E. coli fait 4700kb)
- Gènes portés:
 - ** gènes de résistance aux antibiotiques (gènes de sélection).
 - ** gènes codant pour des toxines et des antibiotiques.
 - ** gènes codant pour la dégradation de certains composés aromatiques
- Sites de restriction uniques à l'intérieur des gènes de sélection.

c) Différentes générations de plasmides bactérien:

- Plasmide de 1ere génération: (ex: ColE1 ou pSC101) C'est avec ces plasmides qu'ont été effectués les 1er clonages (clonage génique). Mais ils avaient besoin d'être améliorés.
- Plasmide de 2nd génération: (ex: type pBR322) dérivé de plasmides naturels.

Fig p 16

- Plasmide de 3eme génération: (ex: famille pUC) dérivé de pBR322, plasmide de 2nd génération. Leur plus petite taille permet d'insérer un fragment d'ADN étranger plus grand.

Fig p 17

vecteur	taille (pb)	nombre de copies par cellule	gènes de selection (sites de restriction liés)	sites de restriction non-liés aux gènes de selection
pBR322	4363	15 à 20	Tétracycline (AcoR V, BamH I) Ampicilline (Pst I, Pvu I)	EcoR I, Hind III, Pvu II, Nde I, Afl III
pUC18	2686	~ 500	lac Z' (13 sites de restriction sur polylinker) Ampicilline	

Le polylinker est intégré en phase: pas de décalage du cadre de lecture. Si on utilise une enzyme, on coupera l'ADN au niveau du polylinker. Un polylinker caractérise une famille.

Fig p 18: Intérêt des plasmides de 3e génération: pUC18

→ la sélection des clones recombinant:

L'opéron lactose du pUC18 est réprimé; on le dérèprime avec de l'IPTG (inducteur non-métabolisable). Le gène lac Z' s'exprime: sécrétion de β -Galactosidase mais il n'hydrolyse pas l'IPTG. La β -Gal s'attaque à un substrat chromogène (générateur potentiel de couleur) la X-Gal que l'on a ajouté avec l'IPTG. L'enzyme sépare le X(bleue) du galactopyranoside ce qui colore la colonie en bleue.

sélection:

colonies bleues = non-recombinées (lac Z' fonctionnel)

colonies blanches = recombinées (gène lac Z' altéré).

- Au début il faut que les souches d'E. coli soient:
 - Lac(-): La bactérie ne doit pas sécréter l'inducteur biologique (Lactose).
 - non-recombinant: Le gène de la β -Gal ne doit pas être altéré par un décalage du cadre de lecture provoquée par l'insertion d'un fragment d'ADN exogène.

vecteur	cellule hôte	ADN	taille de l'insert	pénétration dans la cellule hôte	selection des recombinants
plasmide	E. coli	ADNd	8 à 9 kb	CaCl ₂ Electroporèse	sur des clones bactériens

!! E. coli ne se transforme pas spontanément, il faut faire rentrer le plasmide dans la cellule bactérienne à l'aide de CaCl₂ ou de l'électroporèse. Ces méthodes sont peu efficaces donc il faut sélectionner les cellules bactériennes effectivement transformées. !!

Limite des vecteurs plasmidiques:

- faible taille de l'insert: 8 à 9 kb
- pénétration du plasmide non-spontanée.

2. Les phages:

Les vecteurs phagiques présentent 2 avantages essentiels par rapport aux vecteurs plasmidiques:

- taille de l'insert plus grande (12 à 22kb)
- infection (pénétration de l'ADN) spontanée des cellules bactériennes.

a) Préparation de l'ADN phagique:
Destruction des protéines de capsid et extraction de l'ADN.

b) Encapsidation *in vitro* ou « packaging »:
On reconstitue *in vitro* la dernière étape du cycle lytique (l'encapsidation) avec de l'ADN recombinant. Par auto assemblage, on obtient des phages recombinant.
Fig 3 p 19

c) Les différentes générations de phages:

- Phage de 1ere génération: phage λ
Il possède un ADN linéaire cyclisable grâce aux « séquences cos ». Fig 4 p 19

- Phage de 2eme génération:
 - ➔ dérivé de λ , amélioré (ADNd)
 - ➔ phage monobrin M13 qui infecte également E. coli.

vecteur	cellule hôte	ADN	taille de l'insert	pénétration dans la cellule hôte	selection des recombinants
phage	E. coli	ADNd cyclisable (λ) ADNs (M13)	12 à 22 kb	spontanée après encapsidation	sur plages de lyse

3. Les cosmides:

a) Définition:

Vecteurs totalement artificiels construits à partir d'un plasmide auquel on a ajouté les séquences cos du phage λ . Cet ADN est ensuite encapsidé comme pour les vecteurs phagiques.

vecteur	cellule hôte	ADN	taille de l'insert	pénétration dans la cellule hôte	selection des recombinants
cosmide	E. coli	ADNd circulaire	45 kb	spontanée après encapsidation	sur clones bactériens

La sélection des recombinant s'effectue sur des clones bactériens car le cosmide ne conduit pas à un cycle lytique. On ne peut donc pas utiliser les plages de lyse.

4. Chromosome Artificiel Bactérien (BAC):

C'est un vecteurs servant à cloner de grands fragments d'ADN (100 à 300kb) dans une cellule d'E. coli.

vecteur	cellule hôte	ADN	taille de l'insert	pénétration dans la cellule hôte	selection des recombinants
BAC	E. coli	ADNd circulaire	100 à 300 kb	CaCl ₂ Electroporèse	sur clones bactériens

***Tous ces vecteurs sont pour E. coli (procaryote). Il faut que les souches soient:

- ✓ **res(-):** l'ADN étranger inséré ne doit pas être digéré par les enzymes de restrictions que produit E. coli.
- ✓ **rec A (-):** pour qu'il n'y ai pas de recombinaison entre l'ADN inséré et l'ADN bactérien.

5. Chromosome artificiel de levure (YAC) (Yeast = levure):

Les levures sont des champignons unicellulaires (eucaryotes)

vecteur	cellule hôte	ADN	taille de l'insert	pénétration dans la cellule hôte	selection des recombinants
YAC	Levure	ADNd circulaire	100 à 2000 kb	Ca ²⁺ + PEG* Electroporèse	sur clones de levures

*PEG= PolyEthylène Glycol.