

BIOLOGIE MOLECULAIRE

CHAPITRE III: Le Clonage

I) Définition:

Cloner un fragment d'ADN consiste à:

- isoler physiquement ce fragment.
- en augmenter le nombre de copie (cf: amplification)

II) Principe:

Le clonage consiste à:

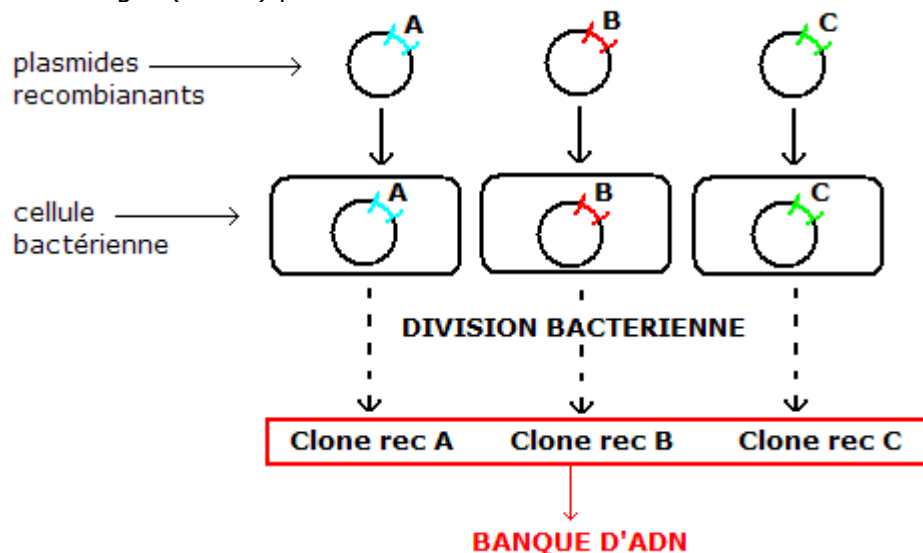
- 1) insérer un fragment d'ADN étranger à cloner (insert) dans un vecteur de manière à obtenir un vecteur recombinant.
- 2) introduire le vecteur recombinant dans une cellule hôte.
- 3) amplifier le vecteur recombinant par division de la cellule hôte, afin d'obtenir un clone recombinant.

ex: si le vecteur est un plasmide:

- 1) création du plasmide recombinant.
- 2) faire pénétrer le plasmide recombinant dans une cellule d'E. coli (CaCl₂ ou Electroporèse).
- 3) division d'E. coli => clone recombinant.

III) Notion de banque d'ADN:

Une banque d'ADN (ou bibliothèque) est une collection de clones recombinants renfermant chacun un ADN étranger (insert) particulier.



IV) Deux types de banque:

1. Banque d'ADN génomique:

On réalise des clones à partir de la totalité de l'ADN chromosomique d'un organisme.

2. Banque d'ADNc:

On réalise des clones à partir d'ADNc provenant des ARNm d'un même type cellulaire.

3. Exemple: Si on voulait cloner le gène codant pour l'hormone de croissance humaine, soit:

- on le clone sous sa forme génomique. Donc on peut partir de n'importe quelle cellule de l'individu. **gène = introns + exons**.
- on le clone sous sa forme ADNc. Il faut donc partir de cellules où le gène s'exprime pour extraire les ARNm des cellules de l'hypophyse et les convertir en ADNc. **gène = exons (transcrit)**.

V) Les banques d'ADN génomiques:

1. Banques d'ADN génomique procaryote:

Prenons l'exemple du clonage d'un gène bactérien G. Comme l'ADN chromosomique de la bactérie est un petit ADN, nous pouvons utiliser les plasmides comme vecteurs. On suit les étapes suivantes:

Fig 1 p 23: Clonage du gène G:

Il faut sortir ce gène et l'amplifier dans des cultures bactériennes.

1) Digestion de l'ADN chromosomique et de l'ADN plasmidique par la même enzyme de restriction:

- L'ADN chromosomique possède plusieurs sites de restriction spécifiques à l'enzyme utilisée: on obtient alors plusieurs fragments d'ADN dont un seul comprend le gène G.
- L'ADN plasmidique ne contient qu'un seul site de restriction spécifique, au sein d'un gène de sélection. L'ADN est ouvert à ce niveau.

2) Ligature: On réunit l'ADN chromosomique fragmenté et l'ADN plasmidique dans le même tube et on ajoute de la T4 ADN ligase (ligatures d'extrémités adhésives ou non). Après cette étape, on peut obtenir 3 types de vecteurs:

- vecteurs recombinants:
 - (1) Plasmide recombinant avec de l'ADN chromosomique ne comprenant pas le gène
 - (2) Plasmide recombinant contenant le gène G
- vecteurs non-recombinants:
 - (3) Plasmide s'étant refermé sans intégrer de fragment d'ADN étranger.

3) Transformation: Il s'agit de vecteurs plasmidiques, donc il faut les faire pénétrer dans les cellules bactériennes (E. coli) grâce à du CaCl₂ ou à l'Electroporèse. Il faut également faire en sorte qu'un seul ADN plasmidique au mieux par cellule.

4) Sélection I (clones transformés): On étale les clones sur un milieu ajouté de l'antibiotique pour lequel le vecteur plasmidique est résistant et dans lequel il n'y avait pas le site de restriction.

- seuls les clones transformés (par (1) (2) ou (3)) survivront car ils auront acquis la résistance à cet antibiotique par le vecteur plasmidique. (attention: il faut que la souche bactérienne soit sensible à cet antibiotique)

5) Sélection II (clones recombinant):

- Si le plasmide utilisé est de type pBR322: On utilise le gène de sélection dans lequel se situait le site de restriction de l'enzyme utilisée. On utilise les clones transformés par (1) (2) ou (3) avec un velours stérile (Fig p 24):
 - ceux qui ne survivront pas sur le milieu comprenant l'antibiotique pour lequel le plasmide utilisé est résistant seront des clones recombinants. En effet, si le gène de résistance comprend un insert, il est altéré et donc il ne s'exprimera pas et les clones seront sensibles à cet antibiotique.
- Si le plasmide utilisé est de la famille pUC: Coloration des colonies (lac Z', cf. chapII: Les Vecteurs).
 - les colonies colorées ne seront pas recombinantes (lac Z' fonctionnel).
 - les colonies blanches seront recombinantes (lac Z' altéré).

nb: l'ensemble des clones recombinants forme une banque d'ADN génomique.

6) Criblage de la banque: Il s'agit de repérer les clones recombinants possédant le gène G. On utilise souvent l'hybridation sur colonies: Fig p 25

- Transfert des bactéries sur filtre de nylon (ou nitrocellulose).
- Lyse des bactéries et dénaturation de l'ADN par NaOH
- Fixation de l'ADN bactérien monobrin par chauffage (= ADNs reste ADNs)
- Hybridation par sonde radioactive spécifique du gène étudié.
- Lavage: élimination des sondes non hybridées
- Autoradiographie:
 - si rayonnement β = sonde hybridée donc présence du gène étudié = recombinant voulu
 - si pas de rayonnement β = pas de sonde hybridée = recombinant sans le gène voulu

2. Banques d'ADN génomique eucaryote:

Les ADN génomiques étant de grande taille, on ne peut pas utiliser les plasmides comme vecteur (trop petit insert). Nous devons choisir des phages ou des cosmides. Dans l'exemple présenté, le vecteur est un phage.

Fig 4 p 26:

1) Digestion: L'ADN phagique et l'ADN génomique sont digérés par la même enzyme de restriction.

- L'ADN phagique est ouvert au niveau du site de restriction.
- L'ADN génomique est fragmenté.

2) Traitement: L'ADN phagique ouvert est traité par la phosphatase alcaline de manière à ce qu'il ne puisse se refermer sur lui-même sans avoir intégré un ADN étranger (fragment d'ADN génomique).

- Action de la phosphatase alcaline: Elle est capable d'hydrolyser les ADN, ARN et nucléotides libres: elle retire le P en 5' et libère donc:
 - un P inorganique
 - une extrémité 5'OH

→ Elle empêche donc l'action des ligases sur les acides nucléiques (car elles ont besoin d'une extrémité 5'P libre sur le brin à lié).

3) Ligation: On réunit les deux digestions en présence de T4 ADN Ligase.

→ Formation d'ADN phagique recombinant

4) Encapsidation

5) Infection

6) Sélection sur plage de lyse: Chaque plaque correspond à 1 phage recombinant avec un insert particulier. L'ensemble des plaques de lyses correspond à la banque d'ADN génomique eucaryote.

7) Criblage: Hybridation de plaque de lyse

Fig 5 p 27

VI) Banques d'ADNc:

1) Extraction des ARN cellulaire: Il faut partir des cellules où s'exprime le gène concerné. Il s'agit d'en extraire la totalité de l'ARN cellulaire (ARNr, ARNt et ARNm) car on ne sait pas sélectionner l'ARNm.

→ On obtient des ARNr, ARNt et ARNm

2) Séparation: On ne veut garder que les ARNm

Cette étape est basée sur la présence d'une queue polyA à l'extrémité 3'OH de tous les ARNm eucaryotes.

Fig 6 p 27:

→ La colonne d'oligo-dT (succession monotone de Thymine) permet de stopper les ARNm grâce aux liaisons H qui s'établissent entre leur queue polyA et l'oligo-dT tandis que les ARNr et les ARNt traversent la colonne.

→ On récupère ensuite les ARNm en éluant la colonne. Attention, on obtient tous les ARNm de la cellule, pas seulement ceux du gène voulu.

3) Synthèse d'ADNc à partir des ARNm par la technique de « copie-entière »:

Fig p 28

a) synthèse du premier brin d'ADN par la transcriptase reverse en présence de dNTP:

- l'amorce est un oligo-dT
- L'ARNm joue le rôle de matrice ARN.

b) Création d'une queue polyC à l'extrémité 3'OH du brin néoformé d'ADN: cette séquence permettra l'hybridation d'une polyG synthétique, amorce de la fonction ADN pol I du fragment de klenow.

c) Destruction de l'ARNm par la soude

d) Synthèse du second brin d'ADN complémentaire au brin synthétisé par la transcriptase reverse grâce au fragment de Klenow. On obtient un ADNc sans séquence intronique: l'ADNc

4) Clonage: insertion des ADNc dans des vecteurs:

→ On peut utiliser les plasmides comme vecteurs puisque les ADNc sont courts (exons uniquement).

