



Laboratoire de Microbiologie et Biologie

Moléculaire

Université Mohamed V - Agdal • Faculté des Sciences B.P. 1014

- Rabat - MAROC

Filière SVI - S6

Module de Génétique et Biologie Moléculaire – M21

Elément 2: Biologie Moléculaire - Pr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF

Exposé réalisé par:

Taraji loubna

Nakach Imane

Raoui sanae

Les plasmides vecteurs de clonage

PRÉSENTÉ PAR: **TARAJI LOUBNA**
NAKACH IMANE
RAOUI SANAE

SOMMAIRE

- ✓ Définition du clonage
- ✓ Définition du Génie génétique
- ✓ Définition du plasmide
- ✓ Caractéristiques des plasmides du clonage
- ✓ Enzymes de restriction
- ✓ ADN ligase
- ✓ Clonage d'un gène dans un plasmide
- ✓ Usage des plasmides recombinants
- ✓ Références bibliographiques

Le clonage

Terme issu du grec klôn : rejeton. Le terme clonage est l'opération qui à partir de cellules isolées, permet d'obtenir une lignée (plusieurs cellules similaires appelées clones) dérivant d'un seul ancêtre.

Clonage (suite)

Lorsque les scientifiques parlent de clonage génétique, ils ne pensent pas à la reproduction d'un organisme mais plutôt à celle d'un gène spécifique. Le clonage génétique est un élément du génie génétique

Le génie génétique

Le génie génétique (ou *ingénierie génétique*) est un ensemble de techniques, faisant partie de la biologie moléculaire et ayant pour objet l'utilisation des connaissances acquises en génétique .

Le génie génétique(suite)

- Il permet :



- d'identifier



- d'isoler



- de transférer



- de modifier de manière contrôlée
le matériel génétique.

Le plasmide

Un plasmide désigne en microbiologie ou en biologie moléculaire une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome. Le terme *plasmide* fut introduit par le biologiste moléculaire américain Joshua Lederberg en 1952.

Le plasmide (suite)

Une cellule bactérienne peut en contenir :

→ pour les grands plasmides => une copie

→ pour les plasmides artificiels (**construits par génie génétique à des fins de clonage de gènes**) => des centaines

Pourquoi les plasmides comme vecteurs de clonage ?

Ont une petite taille

à contrôle de réplication relâché

se multiplient dans les cellules jusqu'à ce que chaque cellule ait en moyenne 10 à 200 copies du plasmide.

portent au moins un gène codant pour un marqueur de sélection

contiennent plusieurs sites de restriction

Introduction aux enzymes de restriction

La biotechnologie moderne, fondée sur la manipulation de l'ADN, permet de modifier et/ou d'analyser des gènes de manière spécifique.

Elle permet aussi de les transférer entre des organismes aussi distincts que des bactéries, des plantes et des animaux. Elle se base sur le génie génétique, qui regroupe les techniques permettant de manipuler l'ADN in vitro. On peut ainsi fabriquer de l'ADN recombinant, une molécule de l'ADN contenant des séquences nucléotidiques provenant d'au moins deux sources différentes

Le principe du clonage:

Le principe du *clonage est simple*. Il consiste à insérer un segment d'ADN étranger dans une petite molécule capable de se répliquer de façon autonome. Ce type de molécule d'ADN est appelé un *vecteur de clonage*. Un *vecteur de clonage courant est le plasmide bactérien*. L'ADN du plasmide est coupé par une enzyme de restriction et lié *in vitro* au fragment d'ADN étranger coupé par la même enzyme de restriction ou une enzyme qui donne des extrémités compatibles. Lorsqu'un transformant stable a été obtenu, la séquence est dite *clonée*.

(Suite)

Parmi les caractéristiques connus pour être de bons vecteurs de clonage c'est que:

- ils doivent porter des marqueurs génétiques particuliers, comme des gènes de résistance aux antibiotiques ou le gène codant la β -galactosidase.

- 
- ils doivent porter un ou plusieurs sites de restriction uniques dans une région qui n'est pas essentielle pour la réplication des plasmides.
 - et si possible, ils doivent avoir des sites de restriction uniques dans des gènes codant des marqueurs sélectifs. Ces marqueurs sont inactivés lorsqu'on y insère un fragment d'ADN étranger. Le choix de ce site est dicté par les connaissances antérieures concernant la cartographie du génome bactérien .

Les enzymes de restriction:

Les enzymes de restriction sont des enzymes qui reconnaissent des séquences de 4 à 8 paires de base appelées « sites de restriction », et y scindent les deux brins d'ADN, comme ils incisent dans le corps de la molécule, on les appelle « endonucléases de restriction ». Ils sont produites par les bactéries pour se protéger de l'ADN étranger provenant d'autres organismes (ex phages).



Les sites de restriction sont de courtes séquences répétées , c'est-à dire identiques sur chaque brin lu de 5' en 3'. Etant donné que l'ADN de chaque organisme possède une séquence propre, les enzymes de Restriction , le tronçonnent en un jeu unique et reproductible de fragments de restriction.



(suite)

L'ADN propre de la bactérie est protégée contre l'incision par un autre enzyme «l'enzyme modificateur », qui le modifie en sites présumptifs de clivage ou en son voisinage, par méthylation d'une ou de deux bases généralement inférieur aux sites de restriction . Ce site une fois méthylé, l'endonucléase n'est plus capable d'y faire la coupure



Beaucoup d'enzymes de restriction produisent des fragments d'ADN à bouts collants le mécanisme est le suivant : Certains enzymes coupent l'ADN au niveau de la même base sur les deux brins, on obtient alors de **fragments à bout franc c'est à dire dont** les nucléotides terminaux sont appariés à leur symétrie comme par exemple ECoR V ou NrUI . Plus souvent, ces enzymes coupent les deux brins de façon décalée, on obtient alors des fragments avec une **extrémité cohésive**. **Si on ajoute un autre fragment avec les mêmes extrémités** cohésives, les bases vont s'apparier. On peut refaire des liaisons covalentes en utilisant une **ADN ligase**.



D'autres coupent l'ADN au niveau des bases en produisant des **fragments à bouts collants** comme par exemple Pst I . Les bouts formés par un enzyme de restriction en un site donné sont complémentaires de ceux de tous les fragments obtenus avec le même enzyme de restriction . A température ambiante, ces régions monocaténaire, qualifiées de bouts collants s'apparient momentanément à celles des autres fragments d'ADN produits par le même enzyme de restriction quelle que soit la source d'ADN.



(suite)

Après restriction, le mélange des fragments d'ADN est soumis à une **électrophorèse sur gel**, qui **sépare les différents fragments en fonction de leur taille**. Après ajout d'un colorant qui s'intercale dans la double hélice de l'ADN, on peut visualiser les différents fragments sous UV.



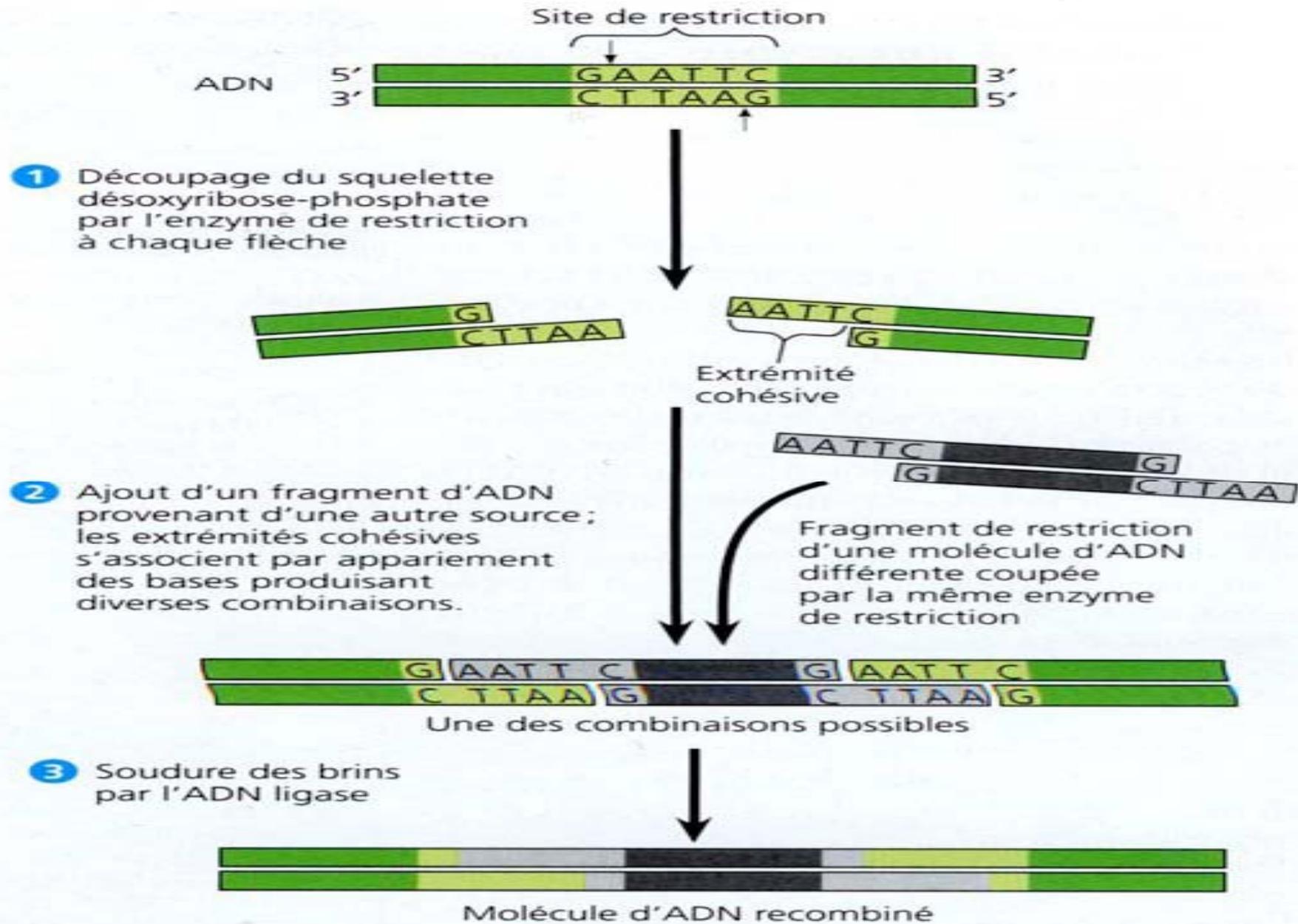


On connaît environ 40 enzymes de restriction qui reconnaissent chacune une séquence différente, appelée **site de restriction**. Voici parmi eux les plus utilisés:

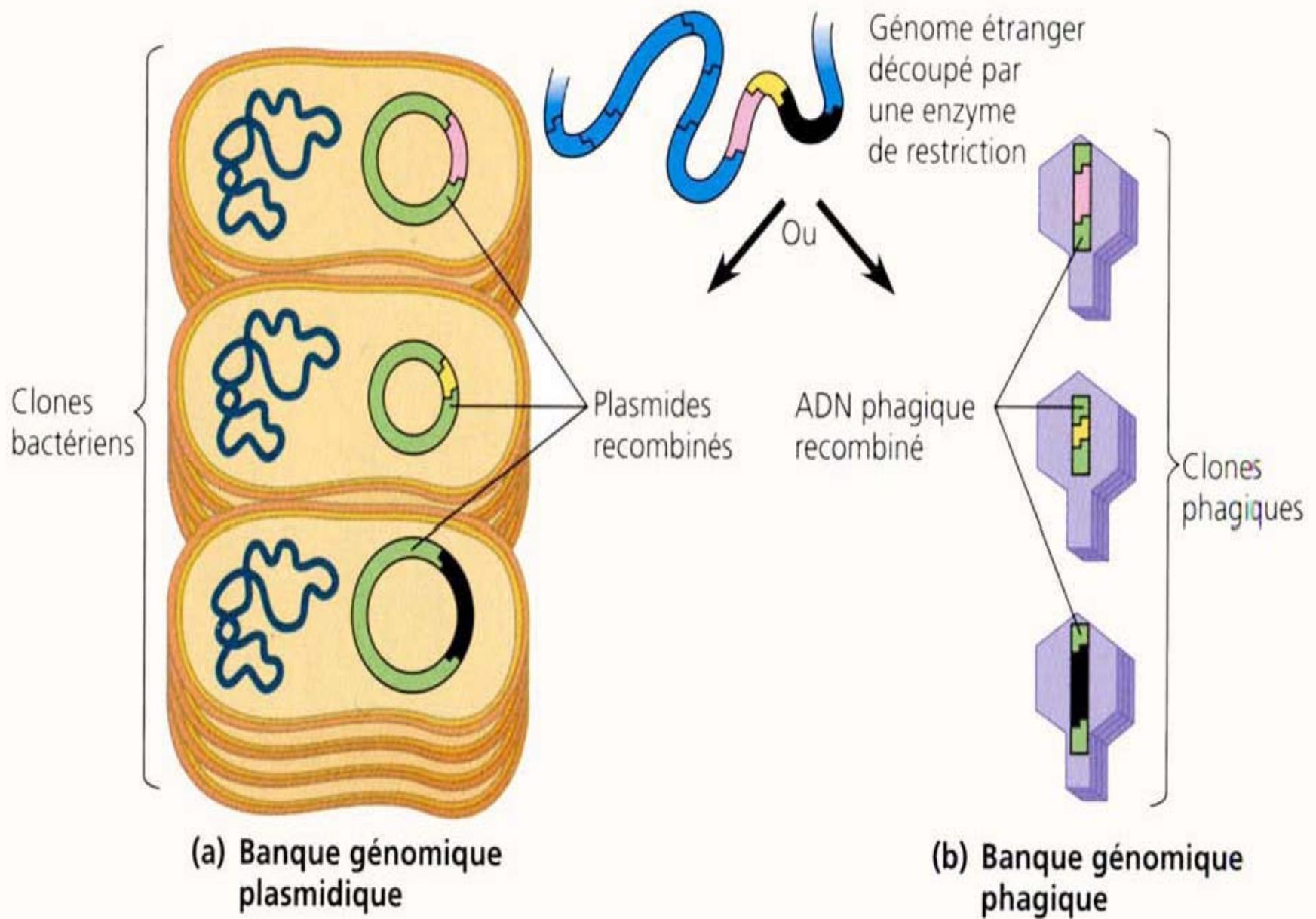
-Alu I , Taq I , Hpb I ,Hga I ,EcoR I ,Hind III , Not I , sfi I .

La technique suivante montre le découpage d'un plasmide par un enzyme de restriction et le recollement .





▲ **Figure 20.3 Production d'un ADN recombiné à l'aide d'une enzyme de restriction et d'ADN ligase.**



► **Figure 20.6** Banques d'ADN.

L'ADN ligase :

C'est un enzyme qui rétablit une liaison covalente entre les fragments de restriction : Quand l'ADN se réplique *in vivo*, l'ADN ligase catalyse la formation phosphodiester 3'-5' entre les courts segments du brin d'ADN synthétisé de façon discontinue au niveau de fourche de réplication. On tire profit de cette ligase purifiée, pour recombinaison des fragments de restriction *in vitro*



Au moment où les bouts sont appariés ,cet enzyme catalyse la formation de liaisons phosphodiester 3'-5' entre l'extrémité 3'-OH du brin d'un fragment et le phosphate 5'-terminal du brin d'un autre fragment de restriction .Il suffit d'ajouter ADN ligase et de l'ATP à la solution de fragments de restriction à bouts collants pour que ceux-ci s'unissent de façon covalente par des liaisons phosphodiester 3'-5' propre aux acides nucléiques



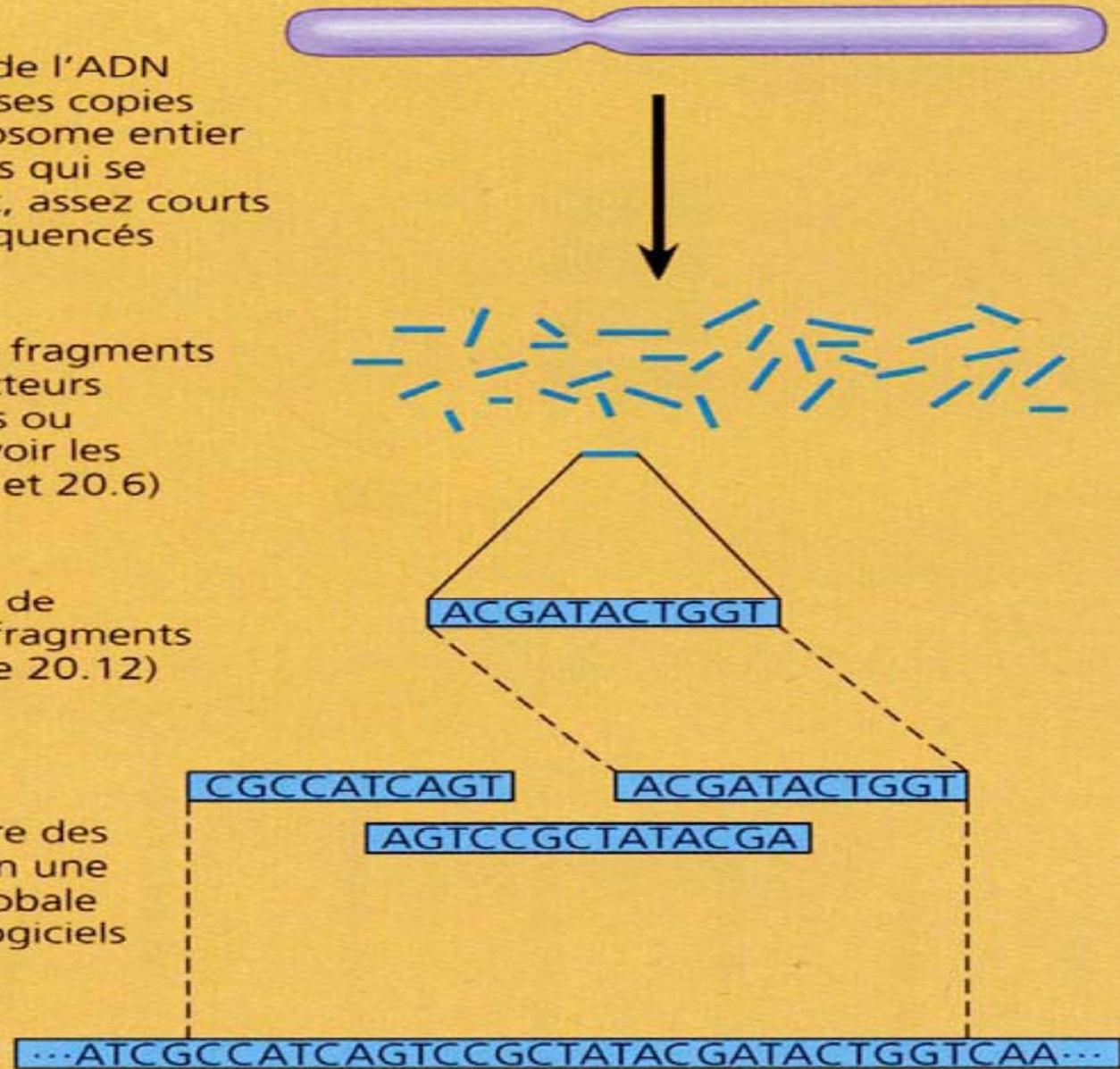
Certains enzymes de restriction incisent 2 brins d'ADN au milieu du site de reconnaissance (Alu I) en formant des fragments à bouts francs , dans ce cas l'ADN ligase purifiée est utilisée pour lier covalamment les extrémités d'un fragments de restriction à celles d'un ADN vectoriel et le fragment qui leurs sont complémentaires. L'ADN vectoriel et le fragment de restriction sont liés covalamment grâce aux liaisons phosphodiester 3'-5' standards d'ADN.

1 Découpage de l'ADN de nombreuses copies d'un chromosome entier en fragments qui se chevauchent, assez courts pour être séquencés

2 Clonage des fragments dans des vecteurs plasmidiques ou phagiques (voir les figures 20.4 et 20.6)

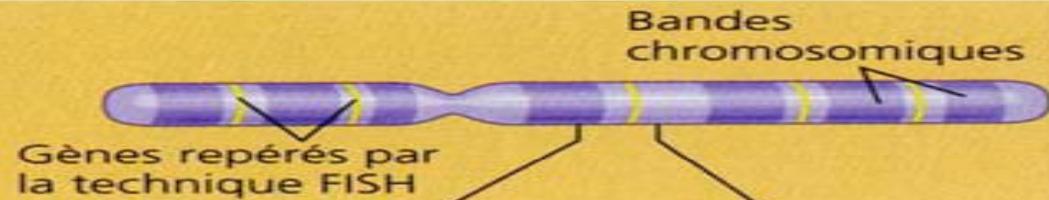
3 Séquençage de chacun des fragments (voir la figure 20.12)

4 Mise en ordre des séquences en une séquence globale à l'aide de logiciels



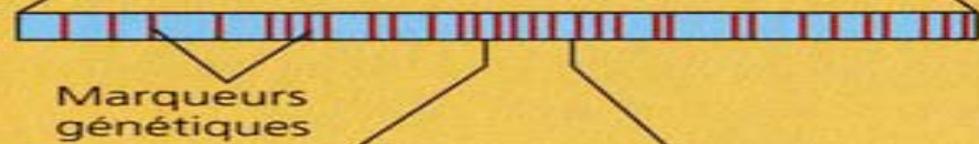
▲ **Figure 20.13** Approche de séquençage en aveugle sur l'ensemble du génome.

Carte chromosomique
Motif des bandes chromosomiques et emplacement de gènes spécifiques par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)



1 Cartographie de liaison génétique

Ordonnement des marqueurs génétiques tels que les PTFR, l'ADN de simple séquence et les autres polymorphismes (environ 200 par chromosome)



2 Cartographie physique

Ordonnement de longs fragments chevauchants clonés dans des vecteurs de chromosome artificiel de levure ou de chromosome artificiel bactérien, suivi de l'ordonnement des fragments plus petits clonés dans des vecteurs phagiques ou plasmidiques



3 Séquençage de l'ADN

Détermination de la séquence nucléotidique de chaque petit fragment et assemblage des séquences partielles en une séquence complète du génome



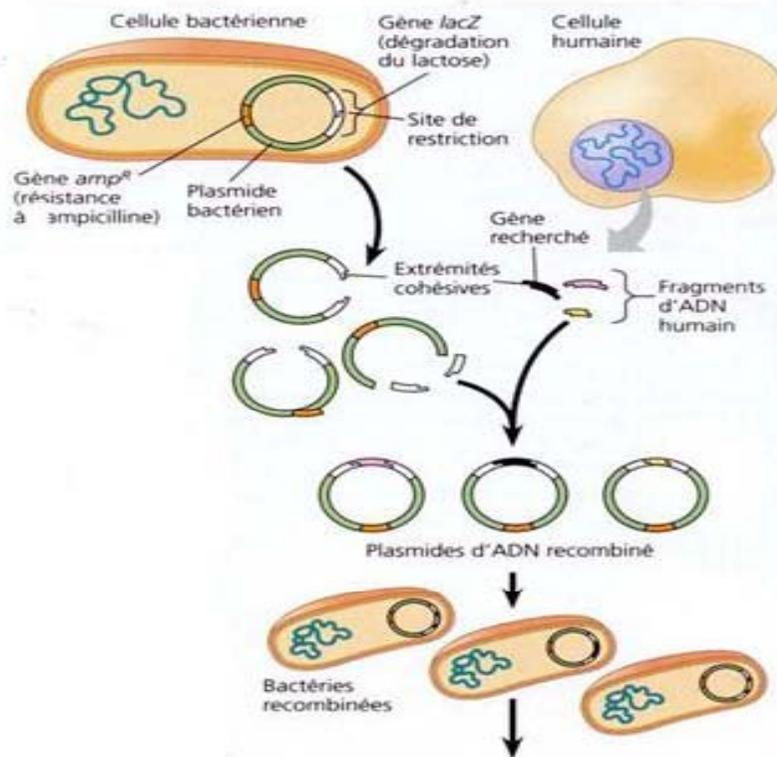
▲ **Figure 20.11** Approche en trois étapes pour cartographier un génome entier.



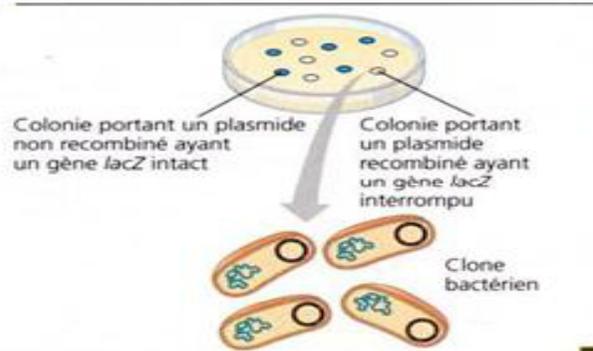
Clonage d'un gène dans un plasmide

Etapes résumant le clonage par les plasmides:

- ❖ Isolement de l'ADN à partir des plasmides des bactéries et de l'ADN de cellules humaines.
- ❖ Action de l'enzyme de restriction
- ❖ Action de la ligase
- ❖ Réintroduction des plasmides dans les bactéries
- ❖ Identification des plasmides recombinés

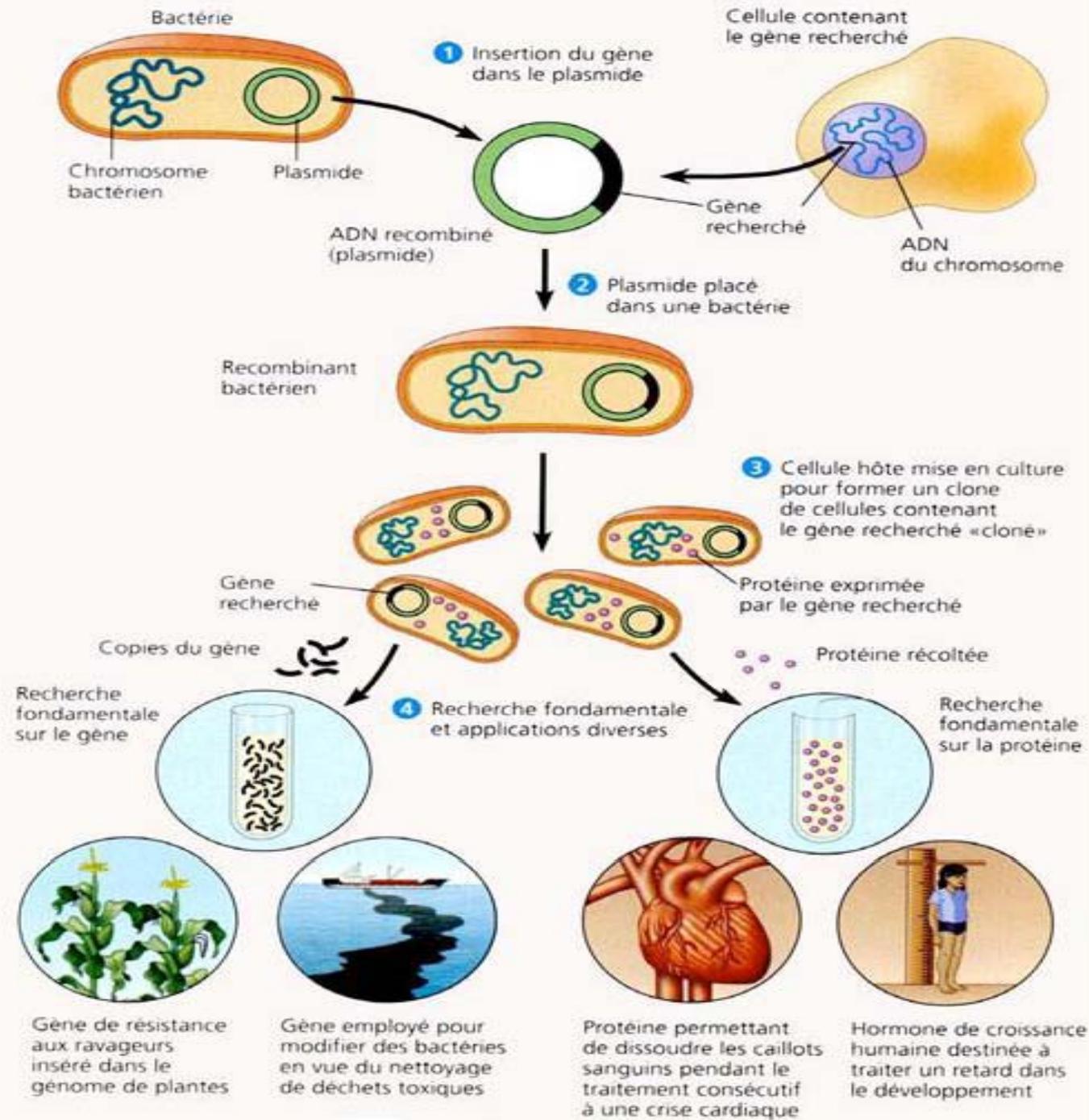


Bactéries étalées sur gélose nutritive contenant de l'ampicilline et de X-gal et du IPTG. Incubation jusqu'à croissance des colonies.





Usage du clonage via plasmide bactérien



Production des vaccins

- **Déterminant antigénique**  introduction du gène correspondant dans les cellules procaryotes ou eucaryotes  protéines vaccinantes
- **Exemple:** protéine vaccinante contre la rage et l'hépatite B.
- le gène recombiné provient de l'agent pathogène et code l'antigène responsable de l'immunisation protectrice

Production d'hormones

- la synthèse chimique de l'insuline humaine étant trop chère et classiquement extraite de pancréas de bovins et porcins.
- A partir de 1983, de l'insuline humaine produite par culture d'*Escherichia coli* a commencé à être vendue en pharmacie
- D'autres hormones ont été également produit par génie génétique tel que : l'hormone de croissance, GRF (Growth hormon Releasing Factor) des expériences ouvrent des perspectives intéressantes pour l'augmentation de production laitière bovine en utilisant ce facteur

Références bibliographiques

- <http://www.bangaloregenei.com/pdf-o8/Genomic-o8/C136.pdf>
- <http://www.univ-lille1.fr/pdv/labo/figdea.pdf>
- BONNES G., DARRE A., FUGIT G., GADOUD R., JUSSIAU R., MANGEOL B., NADREAU N., PAPET A., VALOGNES R. Amélioration génétique des animaux d'élevage. Foucher. Paris : Enseignement agricole formation professionnelle, 1991, 287. (INRAP)

- <http://www.intellego.fr/soutien-scolaire-Terminale-S/aide-scolaire-SVT/Le-clonage-dans-les-plasmides/24149>
- http://209.85.129.132/search?q=cache:NCRUnFxeHPMJ:www.interpharma.ch/chaptero2_f_dl.doc+clonage+et+g%C3%A9nie+genetique&cd=4&hl=fr&ct=clnk&gl=fr
- <http://www.freepatentsonline.com/EPo631626.html>
- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Transg%C3%A9n%C3%A8se>