

LES VECTEURS : Ce sont des molécules nucléiques (généralement ADN procaryotique) qui permettent le transfert de gènes vers un autre organisme. Ce fragment d'ADN peut être :

- Fragment de restriction
- Fragment de PCR
- ADNc

Pour se faire:

- ils doivent être capables de se transférer à l'intérieur d'une cellule cible (cellule réceptrice ou cellule hôte) et posséder des propriétés sélectives pour isoler facilement les cellules hôtes.
- ils doivent être capables de s'auto répliquer activement, une fois à l'intérieur de la cellule hôte, car ils doivent posséder une origine de réplication (le réplicon : structure génétique dont la réplication autonome est indépendante de celle du chromosome).
- Ils doivent posséder un **polylinker**¹ ou site multiple de clonage
- Leurs tailles doivent supporter l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand et permettent la manipulation facile des recombinants.
- Ils doivent posséder des sites de coupure uniques par les endonucléases de restriction. Ces sites doivent être de préférence localisés dans des gènes de sélection pour mieux isoler les recombinants.

3-1/ Utilisation d'un vecteur :

Le **vecteur**, généralement un ADN circulaire, doit être coupé à l'endroit où la séquence à amplifier va être insérée (ou purifiée). Pour éviter que le **vecteur** ne se referme sur lui-même et revenir à son état initial, il faut traiter ses extrémités par une **phosphatase alcaline**.

L'**ADN à insérer** est préparé de façon à ce que ses extrémités soient compatibles (complémentaires) avec celles du vecteur.

Le mélange **ADN à insérer** et **vecteur** sont préparés à des proportions déterminées et en présence d'une **ligase** qui assurera la ligation des extrémités de l'**ADN à insérer** et celles du **vecteur**. Dans le cas où la liaison entre les extrémités du vecteur et de l'ADN à insérer ne se fait pas, il faut envisager de modifier ces extrémités en ajoutant une queue oligo G sur le vecteur et une autre oligo C sur l'ADN à insérer.

Une fois les recombinants purifiés par extraction et précipitation, le vecteur est prêt pour son incorporation à l'intérieur de la cellule hôte. A ce stade un **empaquetage** (packaging) est nécessaire.

La cellule hôte est choisie de sorte qu'elle ne détruise pas l'ADN recombiné qui vient d'y être introduit. Il est alors préférable d'utiliser alors des souches mutantes dépourvues d'enzymes de restriction.

La transformation² est réalisée dans une suspension bactérienne en présence du vecteur recombinant lequel va traverser la membrane rendue perméable suite à des traitements chimiques à base de sel de calcium.

¹ Fragment d'ADN artificiel possédant une série de sites de restriction en exemplaire unique.

Il n'y a pas que les bactéries qui soient utilisées comme cellules hôtes. En effet, certaines cellules eucaryotes peuvent être utilisées.

1. Dans le cas des cellules procaryotes, celles-ci ne doivent pas être pathogènes en raison des risques de dissémination accidentelle. Très souvent c'est la bactérie phare *Escherichia coli* qui est choisie à cause du temps de génération très court (20 minutes en général) par rapport au reste des bactéries. Ces souches sont :
 - des *E. coli* **res**⁽¹⁾ donc ne coupent pas les vecteurs recombinants car elles sont restrictions négatives.
 - des *E. coli* **recA**⁽¹⁾ donc dépourvues de protéine RecA qui permettrait l'association entre deux séquences homologues lors du phénomène de recombinaison. Ceci permet d'éviter une recombinaison dans l'ADN inséré ou entre celui-ci et l'ADN de la cellule hôte (bactérie).
2. Les cellules eucaryotes peuvent être des cellules animales, végétales en culture, ou des levures. Ces hôtes sont utilisés dans des cas extrêmement rares c'est-à-dire dans le cas où l'on désire travailler avec des vecteurs qui possèdent une origine de répllication eucaryotique.

3-2/ LES PLASMIDES : Ce sont des structures d'origine bactérienne dont la nature nucléotidique rappelle l'ADN. Ils sont bicaténaires, circulaires (surenroulés) et extrachromosomiques. Leur taille (2 à 5 Kb) est nettement inférieure à celle du chromosome bactérien mais leur nombre est très grand (plusieurs centaines de copies car se multiplient vite à cause de leur petite taille). Leur répllication se fait indépendamment de l'ADN chromosomique ; ce sont des réplicons. Les plasmides sont transférables d'une bactérie F⁺ vers une autre F⁻ pendant le phénomène de la conjugaison et peuvent supporter jusqu'à 9 Kb d'ADN exogène.

Les plasmides sont des ADN CCC (Covalently Closed Circles), mais si un des deux brins est ouvert, ils sont des ADN OC (Open Circle).

Attention : Tous les plasmides ne sont pas circulaires. Par exemple, les plasmides de *Streptomyces* sp et *Borrelia burgdorferi* sont circulaires et sont protégés de l'attaque des nucléases par une association covalente avec une protéine (*Streptomyces*) ou par la formation d'une structure en épingle à cheveux (*Borrelia*).

Le tableau suivant montre certaines propriétés des plasmides :

² Pour en savoir plus : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/transgen/html/transbac.htm>.

Tableau N°3 : Propriétés de quelques plasmides conjugatifs et non conjugatifs d'organismes gram-négatifs

Plasmide	Taille (MDa)	Conjugatif	Nombre de copies du plasmide	Phénotype
Col E1	4,2	Non	10-15	Production de colicine E1
RSF 1030	5,6	Non	20-40	Résistance à l'ampicilline production de cloacine
clo DF13	6	Non	10	Production de cloacine
R6K	25	Oui	13-38	Résistance à l'ampicilline et à la streptomycine
F	62	Oui	1-2	-
RI	62,5	Oui	3-6	Resistances multiples
Ent P 307	65	Oui	1-3	Production d'entérotoxine

Afin d'utiliser les plasmides, une amplification suivie d'une purification préalable sont nécessaires : voir figure suivante.

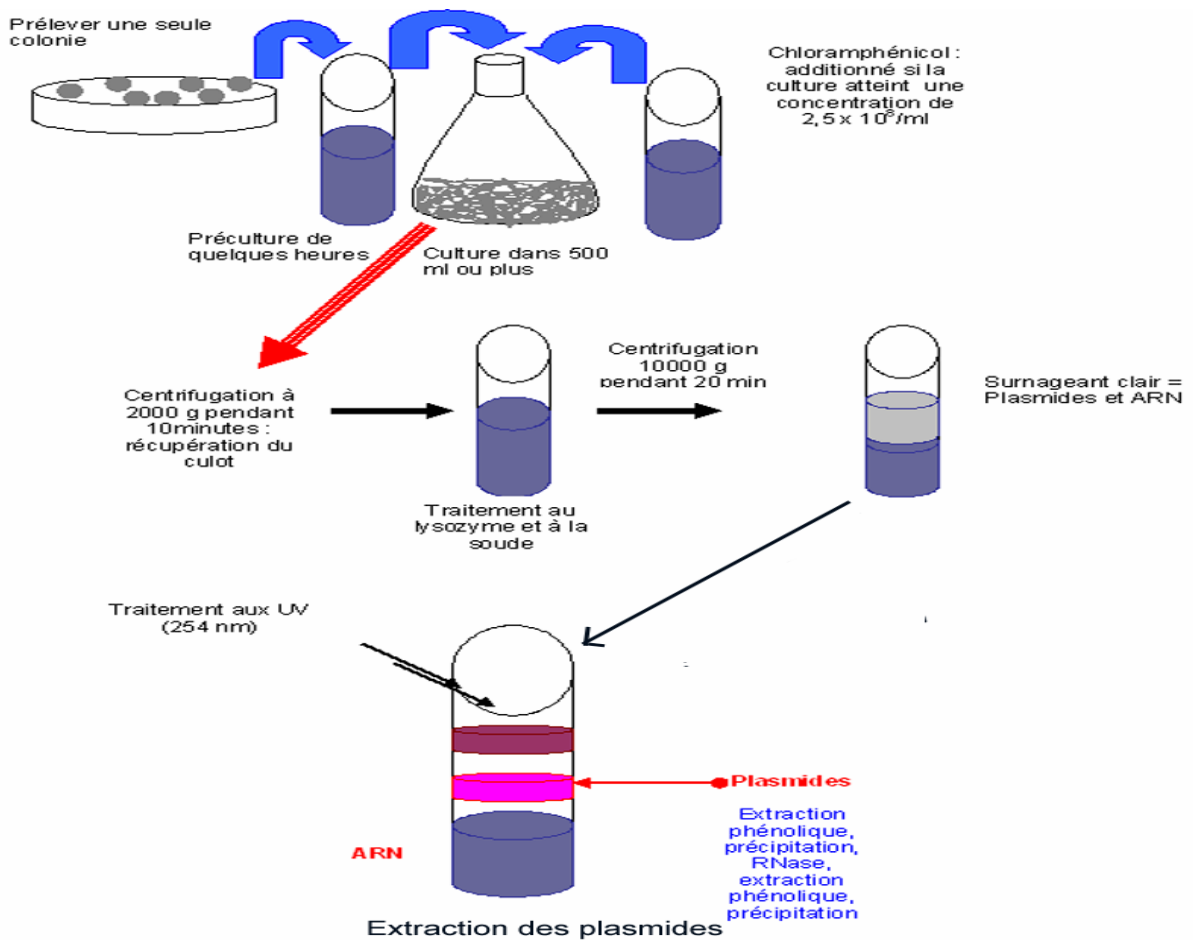


Figure N°9 : Extraction et purification de plasmides

Il existe plusieurs techniques³ de purification des plasmides. La figure suivante (http://pedagogie.ac-limoges.fr/svt/accueil/html/tp-spe-limosin/TP_manip_elem_bio_mol_tech.doc) montre une fiche d'un exemple d'un protocole expérimental d'extraction du plasmide :

FICHE TECHNIQUE : PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE

Principes généraux :

C'est une technique de séparation biochimique par précipitations différentielles et séparation des 2 phases obtenues liquide / solide par centrifugation.

Protocole :

Récupération et lavage des cellules :

Prélever 1.5 ml de suspension bactérienne ; placer en microtubes stériles
Centrifuger à 12 000 g pendant 3 minutes
Éliminer le surnageant
Ajouter 1.5 ml de suspension bactérienne
Centrifuger à 12 000 g pendant 3 minutes
Éliminer le surnageant
Remettre le culot en suspension dans 150 µl de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8 ; EDTA 10 mM

Lyse des cellules :

Ajouter 300 µl de soude 0.2 M, SDS 1% préparés extemporanément ; Laisser agir 5 minutes **au plus**.

Purification de l'ADN plasmidique :

1. Ajouter 225 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2 pour réaliser la précipitation de l'ADN chromosomique dénaturé par la soude et des protéines complexées par le SDS (détergent)
2. Mélanger par retournements successifs 6 à 10 X
3. Placer les tubes dans la glace pendant 10 minutes
4. Centrifuger 10 minutes à 12 000 g à température ambiante
5. Récupérer le surnageant : volume v
6. Ajouter 2v d'éthanol absolu à -20°C et placer à -20°C pendant 30 minutes pour précipiter l'ADN plasmidique
7. Centrifuger 15 minutes à 12 000 g et à 4°C

³ <http://www.molecularstation.com/fr/protocol-links/Microbiology/Mini-Prep-Plasmid-Purification/>

8. Eliminer le surnageant
9. Remettre le culot en suspension dans 300 μ l d'éthanol à 75%
10. Centrifuger 15 minutes à 12 000 g et à 4°C
11. Eliminer le surnageant
12. Sécher le culot quelques minutes à 37°C pour éliminer l'éthanol
13. Remettre le culot en suspension dans 50 μ l d'ED stérile

L'introduction du plasmide recombiné au sein de la bactérie hôte est une étape sensible : c'est la transformation bactérienne.

La culture bactérienne est rendue perméable aux ADN étrangers après simple incubation à une température de 0°C et en présence de chlorure de calcium 50 mM pendant une heure de temps. Les bactéries peuvent d'ors et déjà incorporées l'ADN étranger ; elles dites **compétentes**. Dans certains laboratoires, le sel de calcium est remplacé par une solution de cobalt ou de rubidium pour rendre la bactérie encore plus perméable et donc favoriser sa transfection. Il est même possible d'utiliser la technique d'électroporation⁴ pour introduire le plasmide à l'intérieur de la bactérie hôte par application d'impulsions électriques qui créent un potentiel transmembranaire et provoque une rupture réversible (cicatrisation rapide) de la membrane bactérienne. Ainsi, des pores se forment et permettent à l'ADN de pénétrer dans la bactérie.

On additionne les plasmides à la culture compétente et on laisse agir pendant 30 minutes à 0°C toujours. Une fois ce temps écoulé, on procède à un choc thermique en faisant monter la température brusquement jusqu'à 37°C pendant 1 minute au maximum.

On relance une nouvelle culture de manière classique (température et temps d'incubation propres à la bactérie), puis étalement sur boîtes.

Après culture dans les conditions normales de température et de temps d'incubation, la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide (bactéries recombinantes) est faite en se basant sur un critère de sélection porté par le plasmide et absent chez les bactéries qui n'ont pas incorporé le plasmide. Le critère généralement utilisé est la résistance à un antibiotique. Ainsi, les bactéries ayant incorporé ce plasmide seront donc résistantes et peuvent pousser sur le milieu sélectif contenant l'antibiotique. Cependant, les bactéries sans le plasmide sont sensibles et ne peuvent pousser sur ce milieu.

Question à développer en TD : Comment distinguer entre les bactéries qui ont incorporé un plasmide recombinant et celles ayant incorporé un plasmide vide ?

Astuce : penser à un second marqueur de sélection.

⁴ <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1997/14electropo.htm>

3-2-1/ Les classes de plasmides :

3-2-1-1/ Les plasmides de première génération : Ce sont les premiers à avoir été 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**

3-2-1-2/ Les plasmides de deuxième génération : Ce ne sont pas des plasmides naturels mais résultent de plusieurs transformations : plasmides "artificiels".

La série la plus importante de ces plasmides est la **série pBR 312 à pBR 322**. Le plasmide pBR 322 est constitué de 4,4 Kb et possède deux gènes de résistance : un pour la tétracycline (**Tc^R**), l'autre pour l'ampicilline (**Ap^R**). Il possède, en plus, 20 sites uniques pour les endonucléases de restriction dont 11 localisés sur les deux gènes de résistance :

Tableau N°4 : Localisation des sites de restriction sur les gènes de résistance **Tc^R** et **Ap^R**

Le gène Tc ^R	Le promoteur de Tc ^R	Le gène Ap ^R
Eco RV	Cla I	Pst I
BamH I	Hind III	Pvu I
Sph I		Sca I
Sal I		
Xma I		
Nru I		

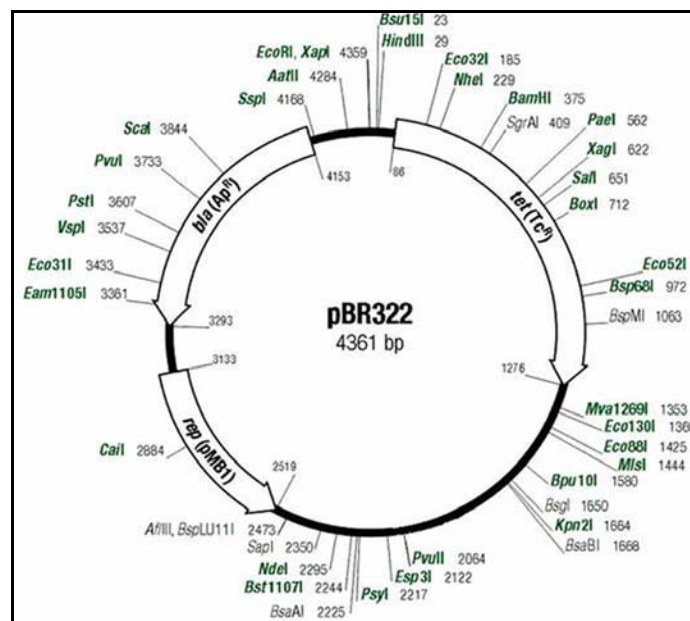


Figure N°10 : Carte du plasmide pBR322

(http://www.edu.upmc.fr/sdv/masslot_05001/genes_et_genomes/vecteurs.html)

3-2-1-3/ Les plasmides de troisième génération : Ce sont des plasmides pBR à l'origine mais rendus plus performants et permettant d'obtenir des recombinants sans passer par des sous-clonages.

Remarque : Un plasmide pUC (plasmide of University of California) est un plasmide pBR dans lequel on a remplacé le gène de résistance à la tétracycline (qui sert à repérer les plasmides recombinés) par un gène bactérien *lacZ*.

3-2-1-3-1/ La famille pUC : Ont une taille qui avoisine 2,6 Kb et ayant intégré les gènes de résistance à l'ampicilline (Ap^R) et *lacZ*. Un polylinker identique à celui du phage M13 est associé à *lacZ*. Les différents pUC (de pUC8 à pUC19) ne diffèrent que par le nombre de nucléotides et l'emplacement du polylinker :

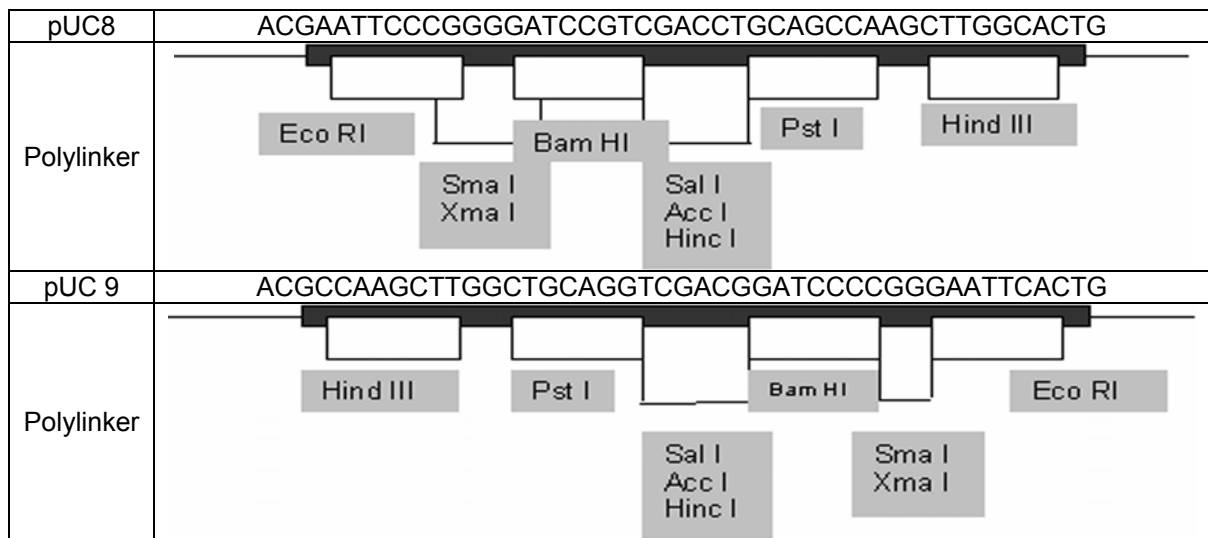


Figure N°11 : polylinkers de pUC8 et pUC9.

Le polylinker du plasmide pUC 19 contient, en plus Sph I, Xba I, Kpn I et Sst I par rapport à pUC8 et Hinc II au lieu de Hinc I.

Remarque : Il existe d'autres familles de plasmides de troisième génération, telles que les familles pSP et pGEM[®].

3-3/ LES BACTERIOPHAGES⁵ : Ce sont des virus bactériens munis d'un système qui leur permet de pénétrer à l'intérieur des bactéries et s'y développer à leurs dépens ; on parlera alors d'infection phagique.

Une fois son ADN inséré, le phage va se proliférer à l'intérieur de la bactérie. Les recombinants bactériens ne sont plus des colonies bactériennes classiques mais des plages de lyse.

Les phages les plus utilisés en génie génétique sont : le phage lambda (de première génération) et le phage M13 (deuxième génération).

Pour obtenir des recombinants bactériens, les phages sont insérés de l'une des deux façons :

- **Insertion simple** : L'ADN phagique est préalablement coupé en un site unique par une endonucléase de restriction, donnant des bouts cohésifs, puis une phosphatase agira sur ses extrémités pour éviter une éventuelle "soudure". Dans ce cas, l'ADN à introduire doit avoir une taille ≤ 12 Kb.
- **Insertion par la technique de délétion-remplacement** : On peut schématiser l'ADN phagique comme un segment de trois parties : Bras gauche + partie centrale + bras droit. Grâce à une ligase, les phages sont ligaturés pour donner des concatémères à couper par des endonucléases. La partie centrale sera déléetée car non indispensable au cycle du phage. Les deux bras (gauche et droit) sont séparés de la partie centrale par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Dans ce cas, l'ADN à introduire doit avoir une taille de 8 à 22 Kb.

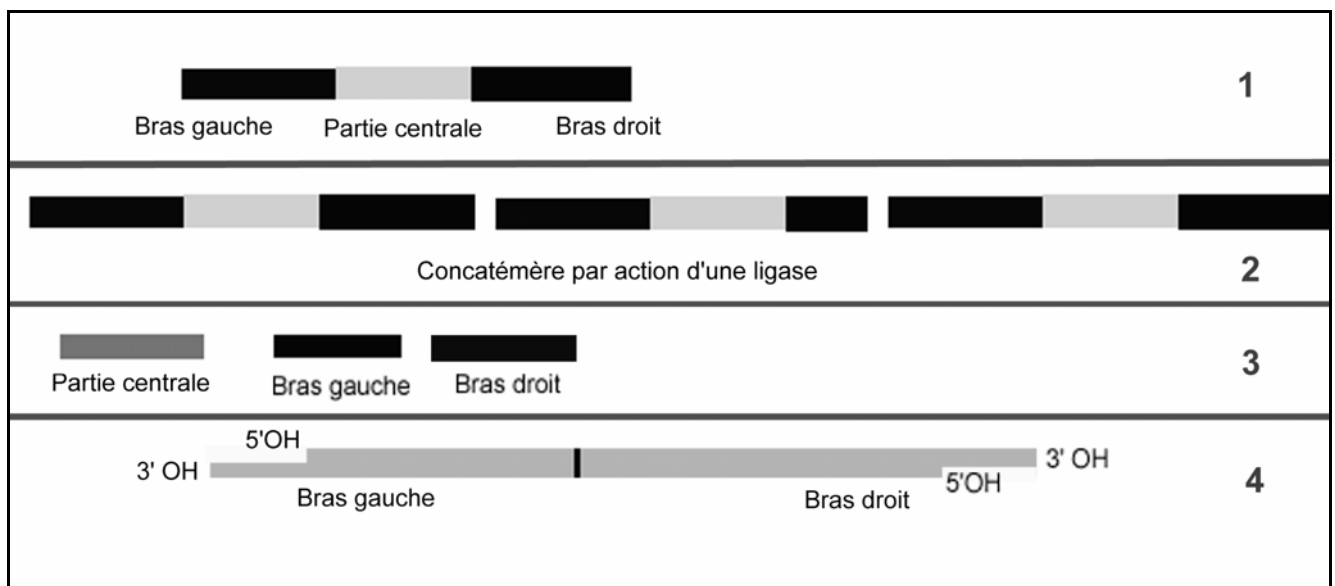


Figure N°12 : Délétion de la partie centrale du génome du phage lambda.

⁵ L'International Committee on Taxonomy of Viruses utilise des italiques pour les noms des bactériophages officiellement acceptés et ce comité préconise l'usage des caractères romains pour les noms des bactériophages non officiellement acceptés, les noms des sous-espèces, les noms des sérovars, ...

Une fois les bras obtenus après action de la ligase, ils sont additionnés à l'ADN à insérer en présence d'une ligase pour obtenir un long concatémère de recombinants. Mais ce dernier n'est pas "opérationnel" car c'est n'est qu'un ADN phagique nu. Il faut procéder à son encapsidation *in vitro*. Cette étape est réalisée en présence d'ADN concatémère phagique et de protéines et permet de reformer un phage "synthétique" capable d'infecter la bactérie comme un phage naturel.

Les phages les plus utilisés appartiennent à deux générations : les phages de première génération et les phages de deuxième génération.

Les phages de première génération sont représentés par le **phage lambda**. C'est le phage le plus utilisé. Morphologiquement, il est formé d'une tête et d'une queue pour se fixer sur la bactérie hôte. A l'intérieur de la tête se trouve renfermé l'ADN. Celui-ci est linéaire et bicaténaire et mesure 48,502 Kb environ. Les deux extrémités 5' des deux brins sont plus longues de 12 nucléotides et sont complémentaires entre elles. Elles sont donc cohésives et sont annotées cos L et cos R (pour Left et Right) :

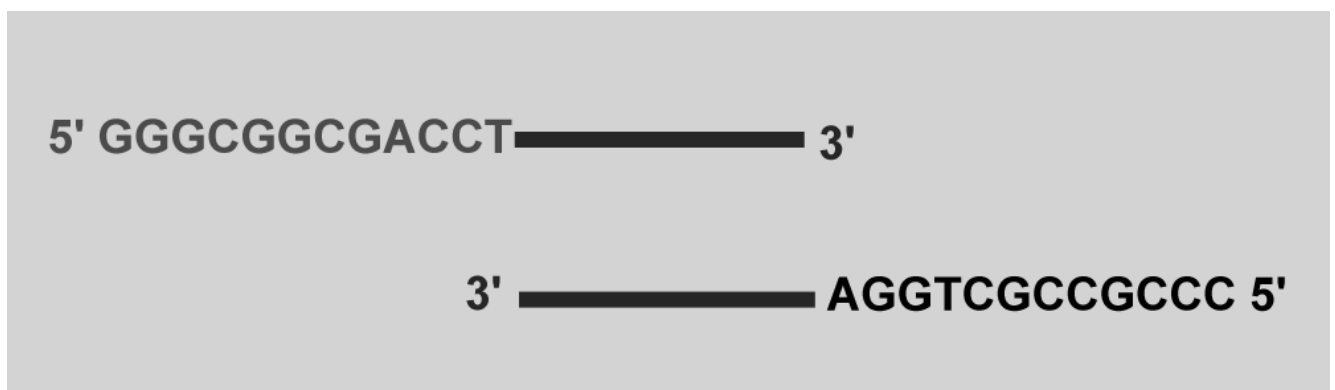


Figure N°13 : Extrémités cohésives du phage lambda.

Les phages de deuxième génération comportent les phages :

- EMBL 3 et 4
- Les phages λ GEM® 11 et 12
- Phage λ gt 11
- Phage monobrin M13

Le génome du phage M13 est circulaire, mesure 6,4 Kb et contient 10 gènes. Il n'infecte que les bactéries F⁺. Son intégration à l'intérieur d'une bactérie F⁻ se fait avec transformation.

3-4/ LES COSMIDES : Ce sont des vecteurs non sauvages (synthétiques ou artificiels). Fabriqués à partir de la combinaison de plasmides (donc possibilité de réplication) et de séquences cos du phage lambda (possibilité de pénétration à l'intérieur des bactéries). Ils permettent d'intégrer des fragments d'ADN plus long (environ 45 Kb).

L'utilisation du cosmide passe par son ouverture par une enzyme de restriction puis une attaque des extrémités par une phosphatase.

L'ADN à insérer (de 35 à 45 Kb) est ajouté au cosmide, puis l'hybride ainsi obtenu est empaqueté dans les têtes de phages qui vont infecter les bactéries hôtes sans les détruire mais vont se comporter comme des plasmides et donner des colonies bactériennes au lieu de plages de lyse.

3-5/ LES CHROMOSOMES ARTIFICIELS : Ce sont des chromosomes artificiels (ou minichromosomes) contenant de petites régions spécifiques du chromosome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Artificial Chromosomes ou **YAC**) et l'ADN à cloner. Ces régions sont :

- Région télomérique (**TEL**)
- Région centromérique (**CEN**) : assure la migration correcte du minichromosome
- Région pour la réplication (**ARS**) : **A**utonomous **R**eplicating **S**equence

On y retrouve également les éléments essentiels des chromosomes :

- une origine de réplication qui est en phase avec les origines chromosomiques naturelles.
- un site unique de clonage
- un ou plusieurs marqueurs de sélection (un par élément constitutif).

Le chromosome artificiel hybride **pYAC2** est l'un des plus simples. Il est construit avec les séquences bases : la région centromérique (CEN4), la région pour la réplication (**ARS**), deux séquences télomériques (TEL), les séquences URA3 et TRP1 (pour sélectionner les cellules ayant intégré un YAC), et le gène *SUP4* (pour sélectionner les cellules ayant intégré un YAC recombinant).

Le YAC recombinant est obtenu suite à l'action double (sur deux sites) d'une BamH I suivi d'une action de la phosphatase. Le résultat de cette action est l'élimination du gène *HIS3* :

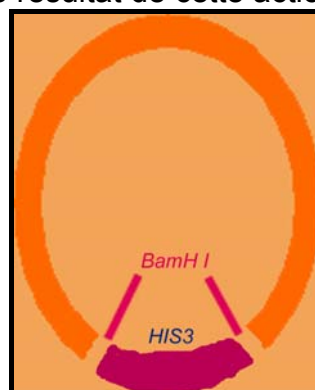


Figure N°14 : Elimination du gène *HIS3* par BamH I et linéarisation du YAC

Le chromosome rendu linéaire est soumis à l'action d'une Sma I pour obtenir les deux bras gauche et droit puis à l'action d'une phosphatase alcaline :



Figure N°15 : Bras gauche et droit du YAC après action de Sma I

L'ADN à insérer au milieu des deux bras est obtenu par action d'une endonucléase spécifique qui permet d'obtenir des bouts francs. Une ligase permet au mélange bras gauche + bras droit + ADN à insérer d'être lié pour être ensuite introduit dans des cellules de levures par transformation.



Figure N°16 : Bras gauche et droit du YAC après insertion de l'ADN (150-1000Kb)