

Licence d'Informatique Année 2001-2002

Option: Introduction à la biologie moléculaire

SAHLA MAHLA
Clonage et vecteur de clonage
ou
Technologie de l'ADN
recombinant

Principes

ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupure de l'ADN
en fragment contenant de un à
plusieurs fragments d'intérêt.

VECTEUR

Ou transporteur d'ADN.
C'est un fragment d'ADN
capable de réplication autonome.

insertion individuelle de chaque
fragment d'ADN dans une molécule
de **vecteur**.

Obtention de l'**ADN recombinant**

Nouvelle combinaison de l'ADN d'un **génome donneur** (qui peut être de n'importe quel organisme) avec l'ADN d'un **vecteur** qui peut être d'origine complètement différente.

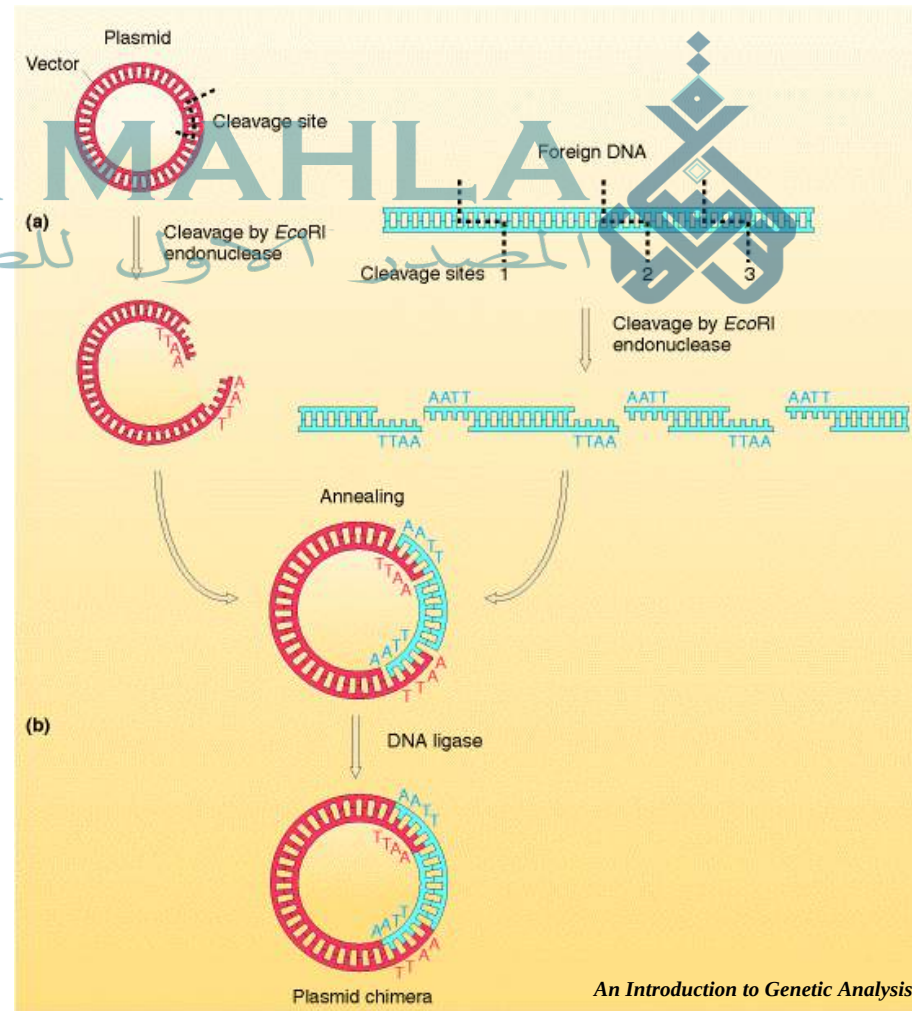
SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

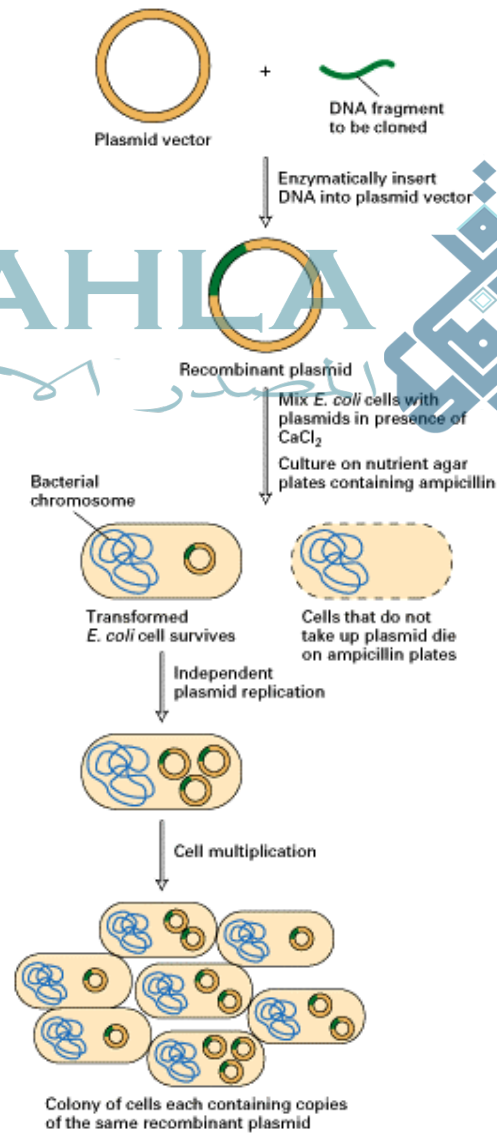


Le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur permettant ainsi d'en obtenir plusieurs copies

Obtention de l'ADN recombinant



Procédure complète



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

- Les cellules hôtes

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

- Les intérêts du clonage?

Questions?

•Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

•Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?

•Quels sont les vecteurs de clonage?

•Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

•Les cellules hôtes

•Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

•Les intérêts du clonage?

Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

A partir de l'ADN génomique:

L'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme.

Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même.

Ordre d'idée de la taille des génomes

Espèce modèle	Taxon	Nb de chromosomes	Taille du génome	Nb de gènes estimé
Virus de la grippe	Virus	ARN simple brin	13 500 bp	12
Bactériophage T4	Virus	1 (circulaire)	165 000 bp	200
Escherichia coli	Bactérie	1 (circulaire)	4,7 Mb	4000
Saccharomyces cerevisiae	Ascomycète	16	14 Mb	6000
Arabidopsis thaliana	Crucifère	5	100 Mb	25000
Caenorhabditis elegans	Nématode	6	100 Mb	13500
Drosophila melanogaster	Insecte	4	165 Mb	12000-16000
Mus musculus	Mammifère	20	3400 Mb	25000-30000
Homo sapiens	Mammifère	23	3400 Mb	25000-30000

Homme/Souris	3,000 M b
Nématode	97 M b
Drosophile	160 M b
<i>S. cerevisiae</i>	12 M b

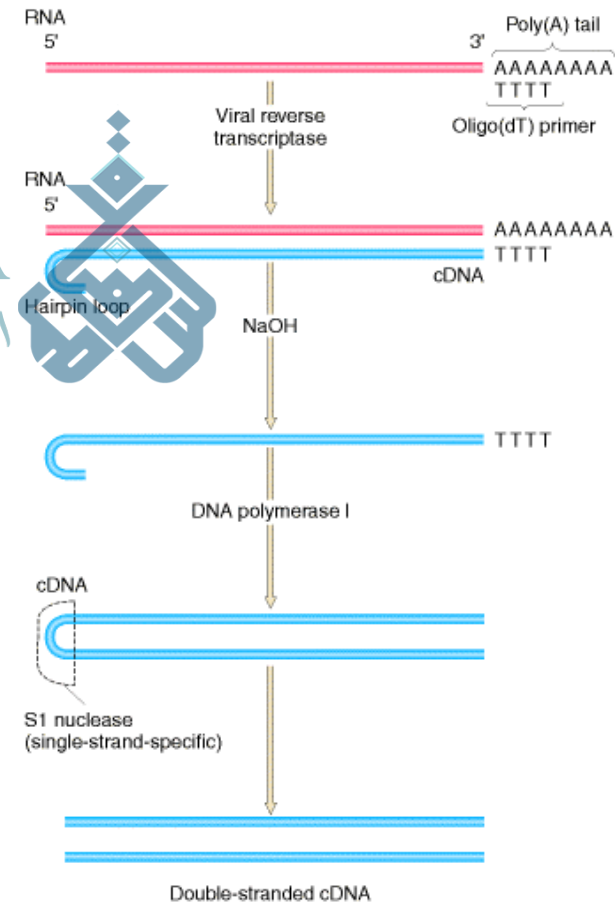
Nombre de gènes

Homme /Souris	30 000
Nématode	20 000
Drosophile	14 000
<i>S. cerevisiae</i>	6 200

Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

A partir de l'ARN:

Principe de la reverse transcription:



An Introduction to Genetic Analysis

Dans ce cas là, quel matériel de départ prendriez-vous?

Toutes les cellules expriment-elles le même gène?

Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

A partir de l'ARN:

Comme pour l'ADN génomique, l'ARN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers. Mais chaque type cellulaire exprime un lot donné de gènes donc pour un organisme donné on part d'un lot judicieux de cellules; l'ARN est différent pour chaque type cellulaire.

Donnez un exemple.

Informations portées par l'ADN donneur



Quelles sont ces informations?

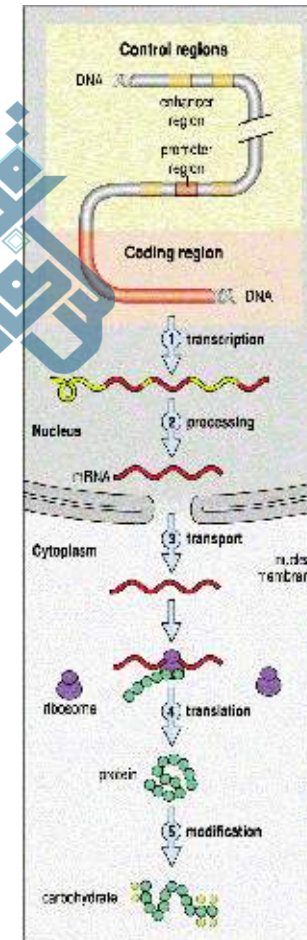
Informations portées par l'ADN donneur

Sur l'ADN génomique:

région codante et non codante
(régions promotrices, régulatrices)

Sur l'ADN complémentaire:

région codante,
mais il y a aussi les régions (5'et 3' non traduites)



Sélection du fragment d'ADN voulu



Différentes possibilités sont envisageables; l'une d'entre elles est le criblage de banque.

Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

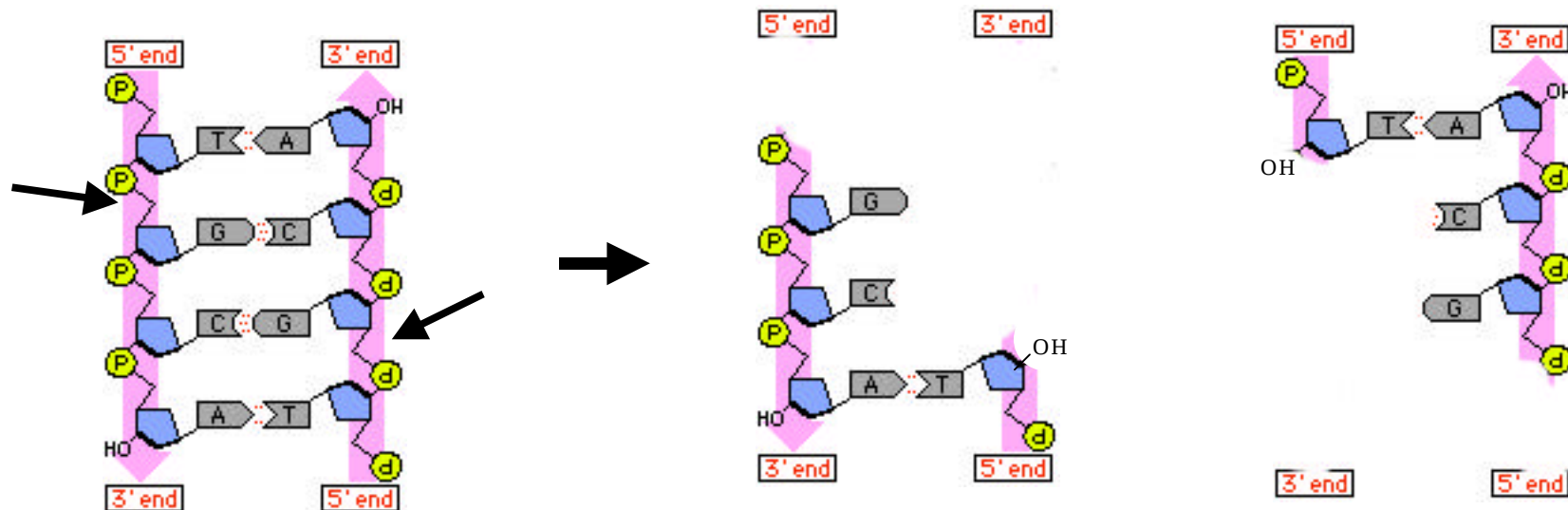
- Les cellules hôtes

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

- Les intérêts du clonage?

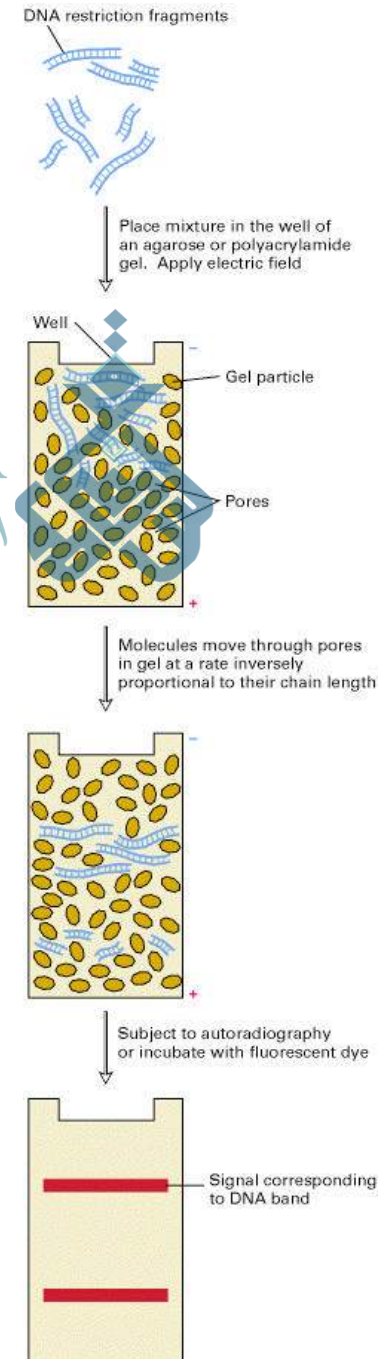
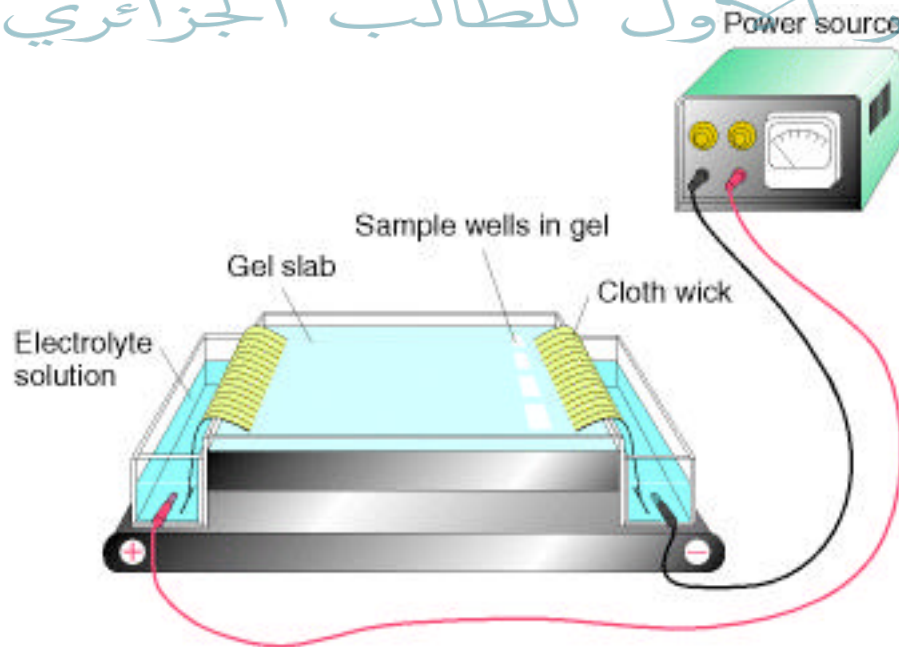
Les enzymes de restriction

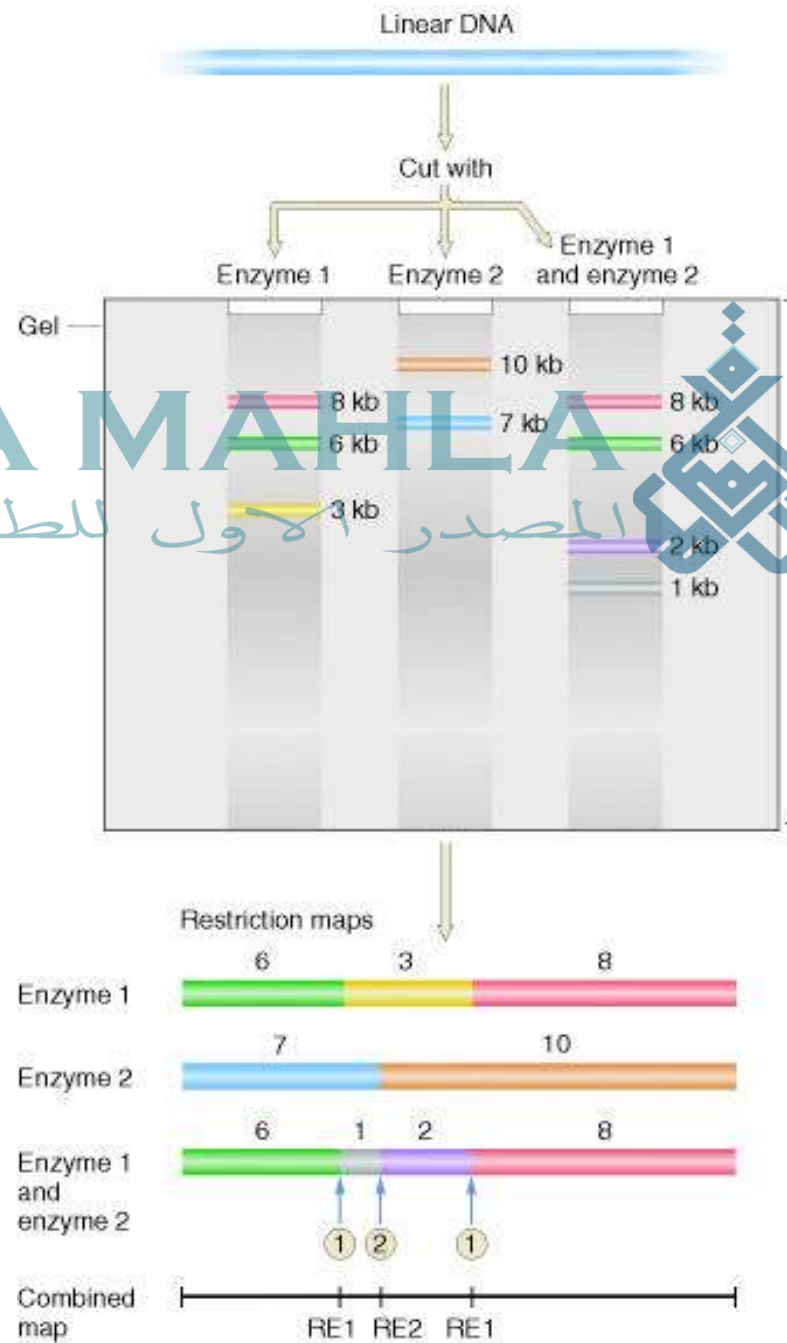
Définition: les enzymes de restriction sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.



Visualisation des fragments de restriction

SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري





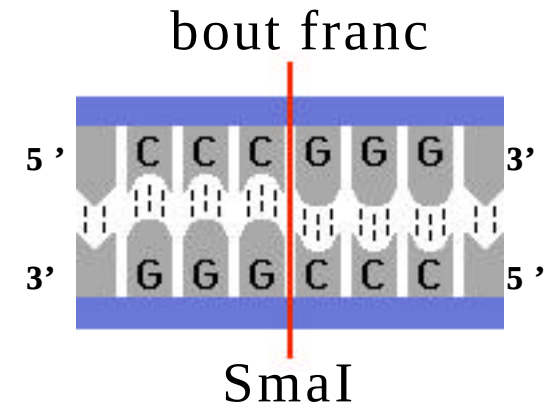
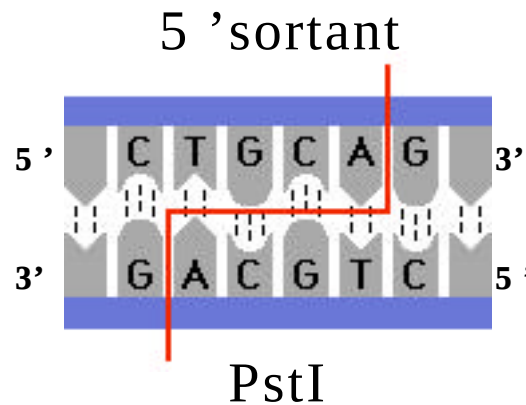
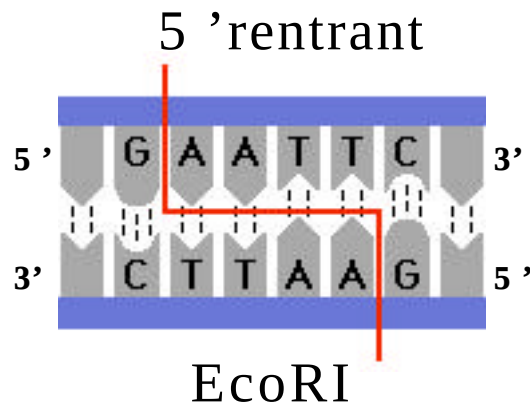
Les enzymes de restriction

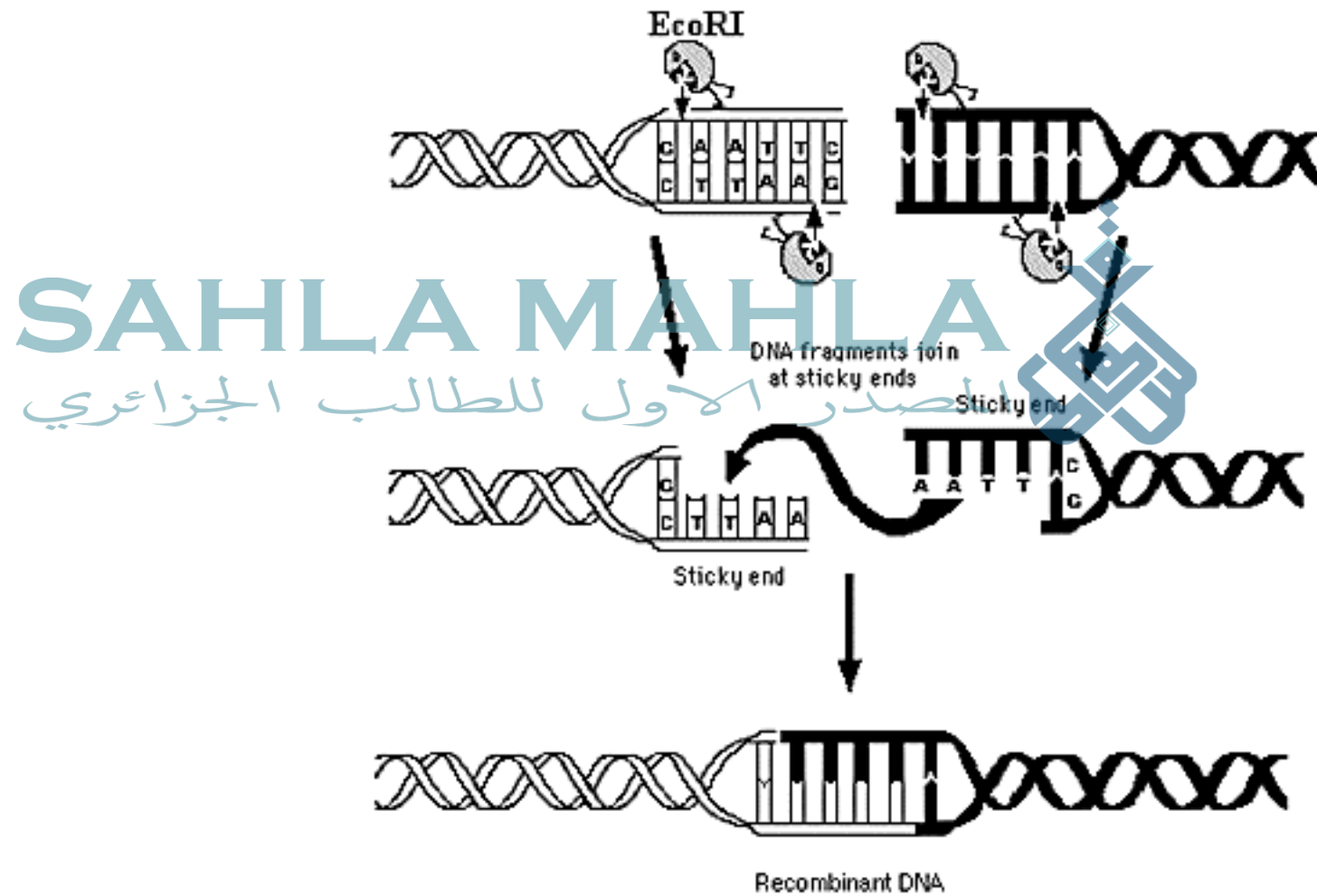
Caractéristiques:

- la plupart des sites sont des séquences inversées répétées:

cas de EcoRI: 5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

- Coupure avec formation de bouts collants ou à bouts francs:





Restriction Enzyme Action of EcoRI

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
Ava I	Anabaena variabilis	C* C/T C G A/G G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G* G A T C C
Bgl II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	*C C A/T G G
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainflenzae	G T T * A A C
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C * C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A * G
Sma I	Serratia marcescens	C C C * G G G
SstI	Streptomyces stanford	G A G C T * C
Sal I	Streptomyces albus G	G * T C G A C
Taq I	Thermophilus aquaticus	T * C G A
Xma I	Xanthamonas malvacearum	C * C C G G G

Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

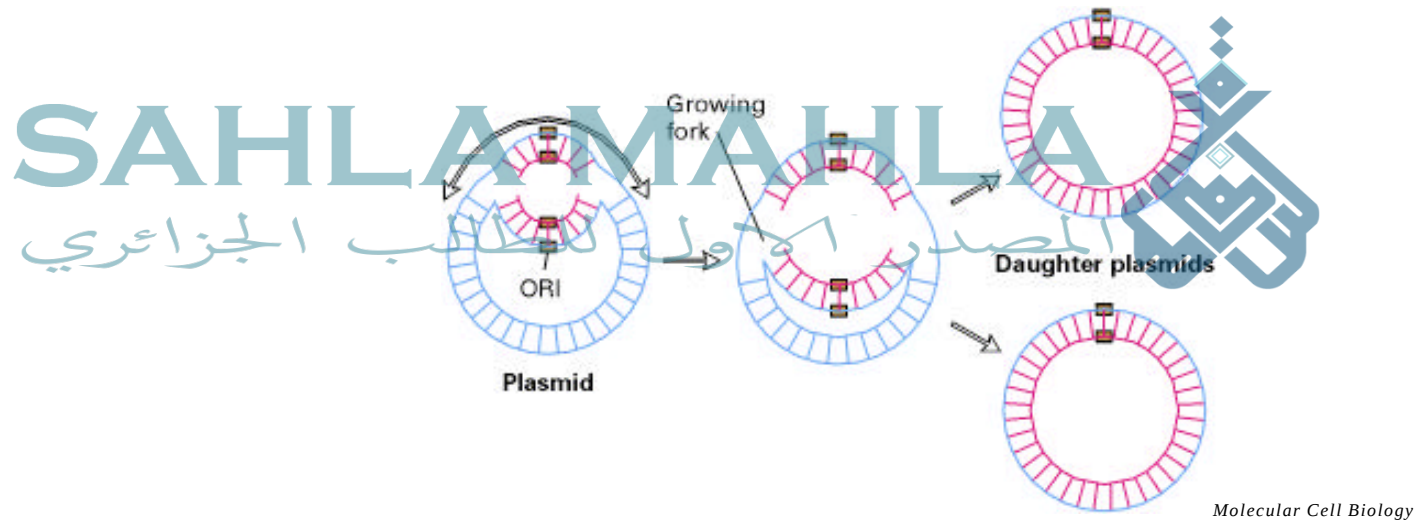
- Les cellules hôtes

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

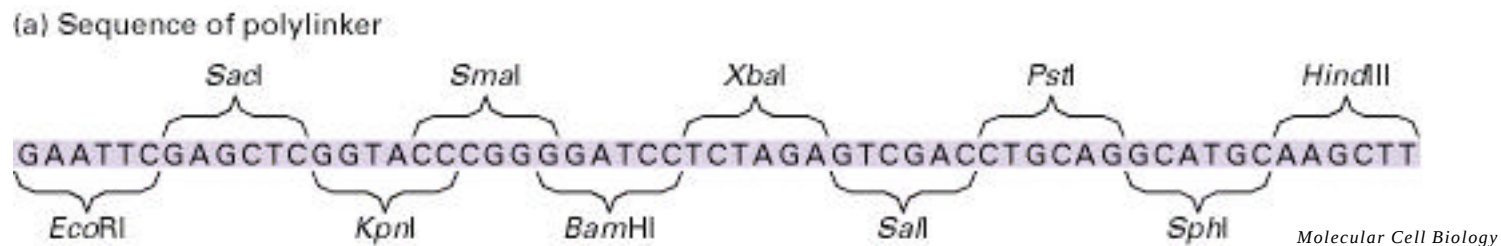
- Les intérêts du clonage?

Propriétés des vecteurs de clonage

- capables de réplication autonome dans une cellule hôte donnée
(origine de réplication de type procaryotique et/ ou eucaryotique)



- possède un polylinker ou site multiple de clonage



- supporte l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand

Différents vecteurs de clonage

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromo some)	300
YAC (yeast artificial chromo some)	1000

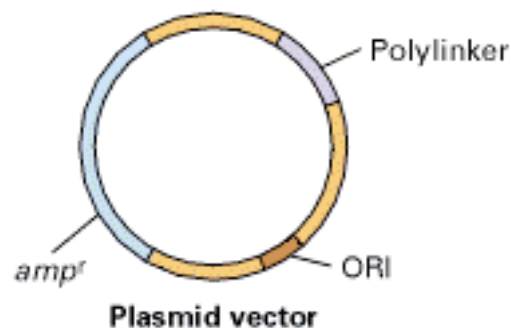
Les plasmides comme vecteurs de clonage

Molécule d'ADN de taille réduite

Molécule d'ADN circulaire

Peut être considérée comme un minichromosome capable de répllication autonome

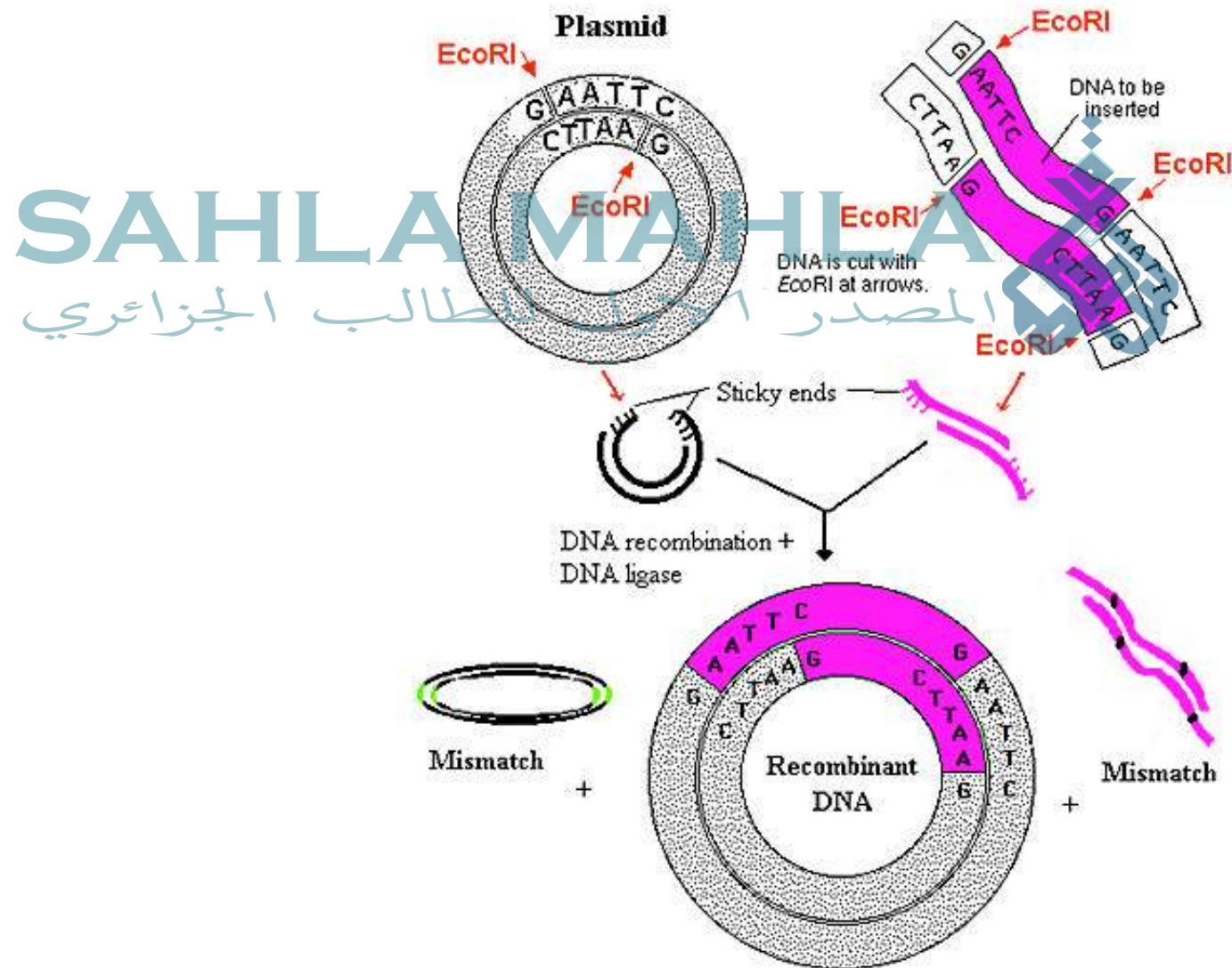
Permet la résistance à un antibiotique



Molecular Cell Biology

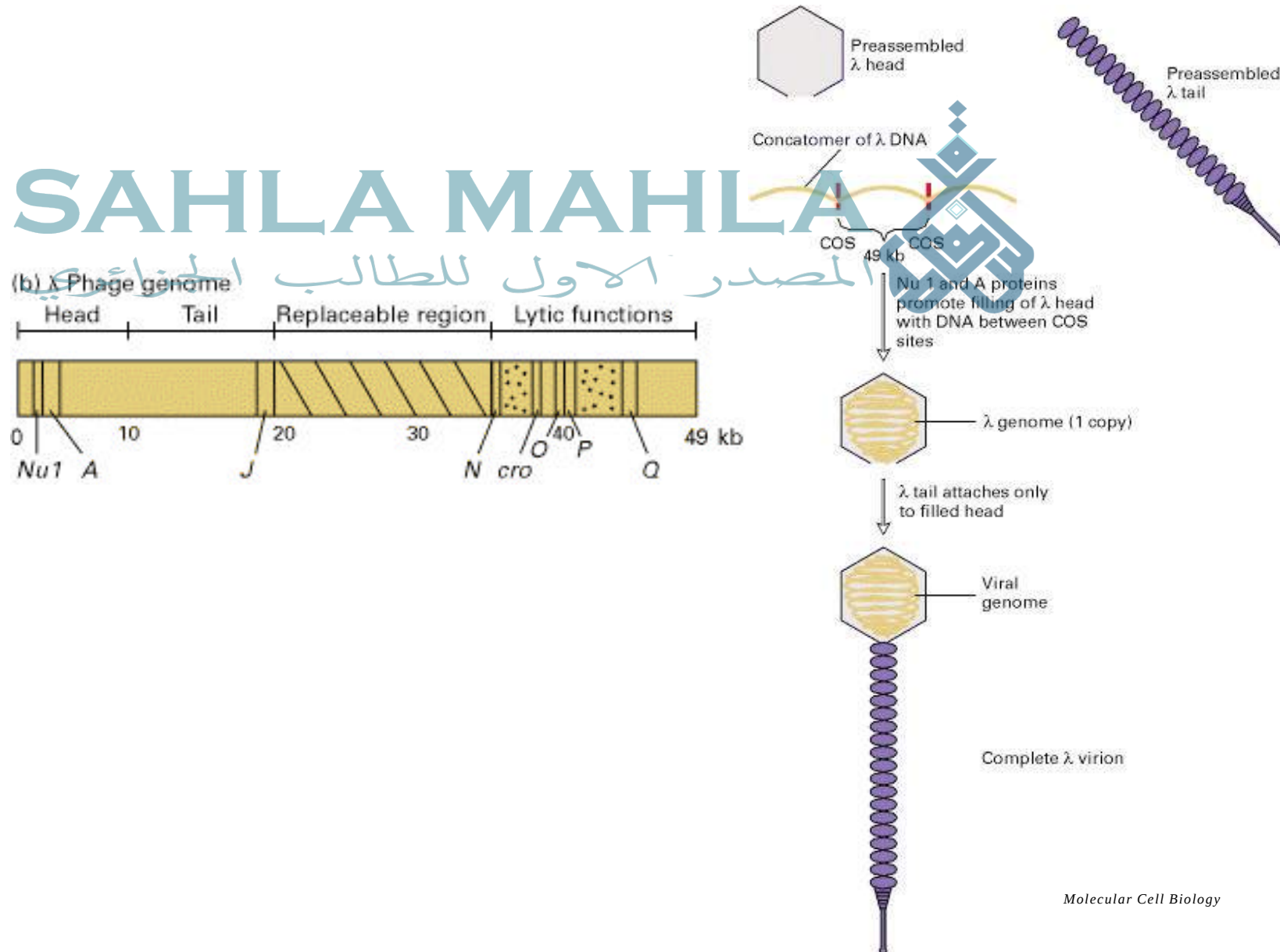
Quel type d'origine de répllication choisiriez vous?

Les plasmides comme vecteur de clonage

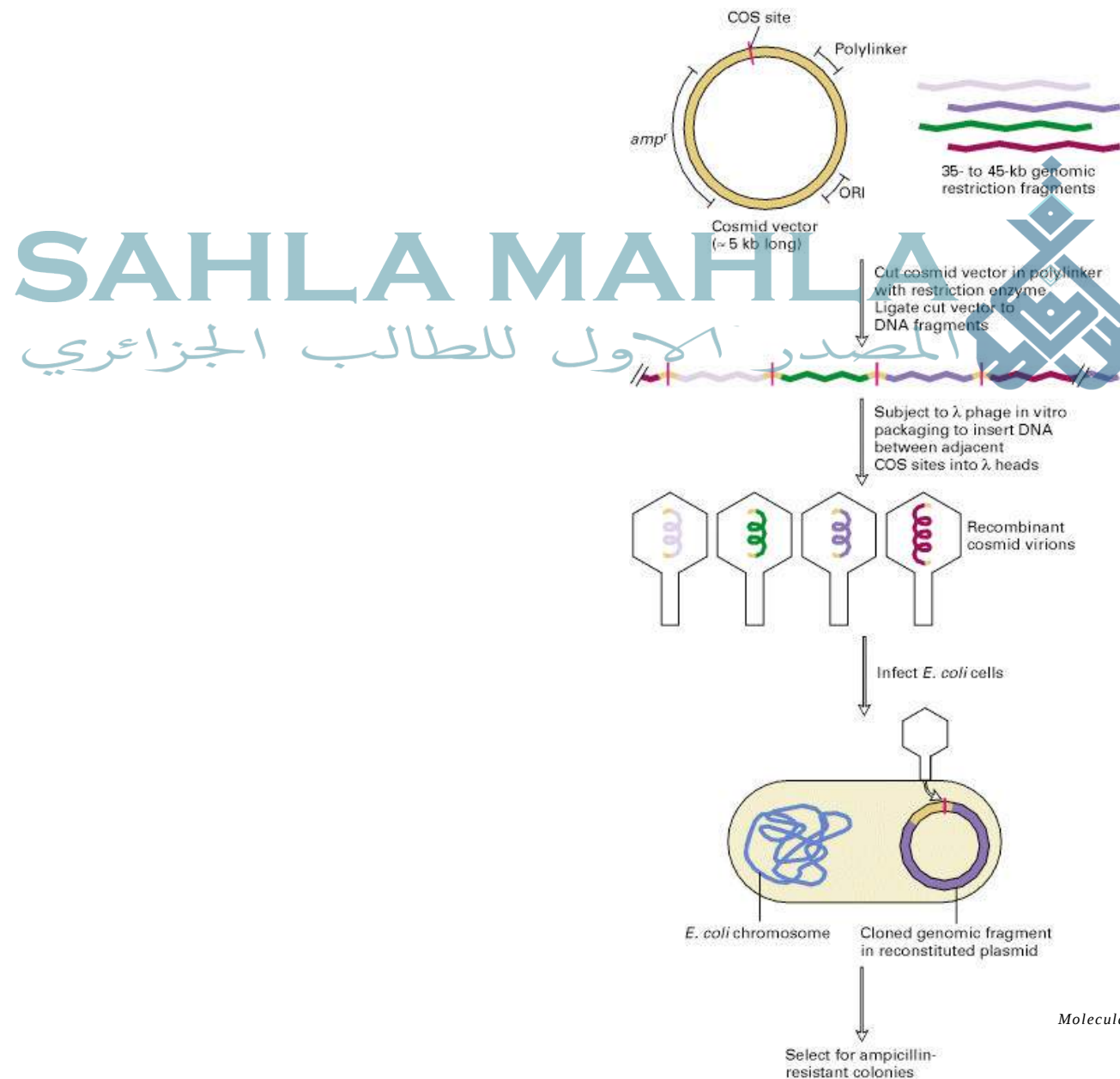


Quelles molécules sont capables de se répliquer?

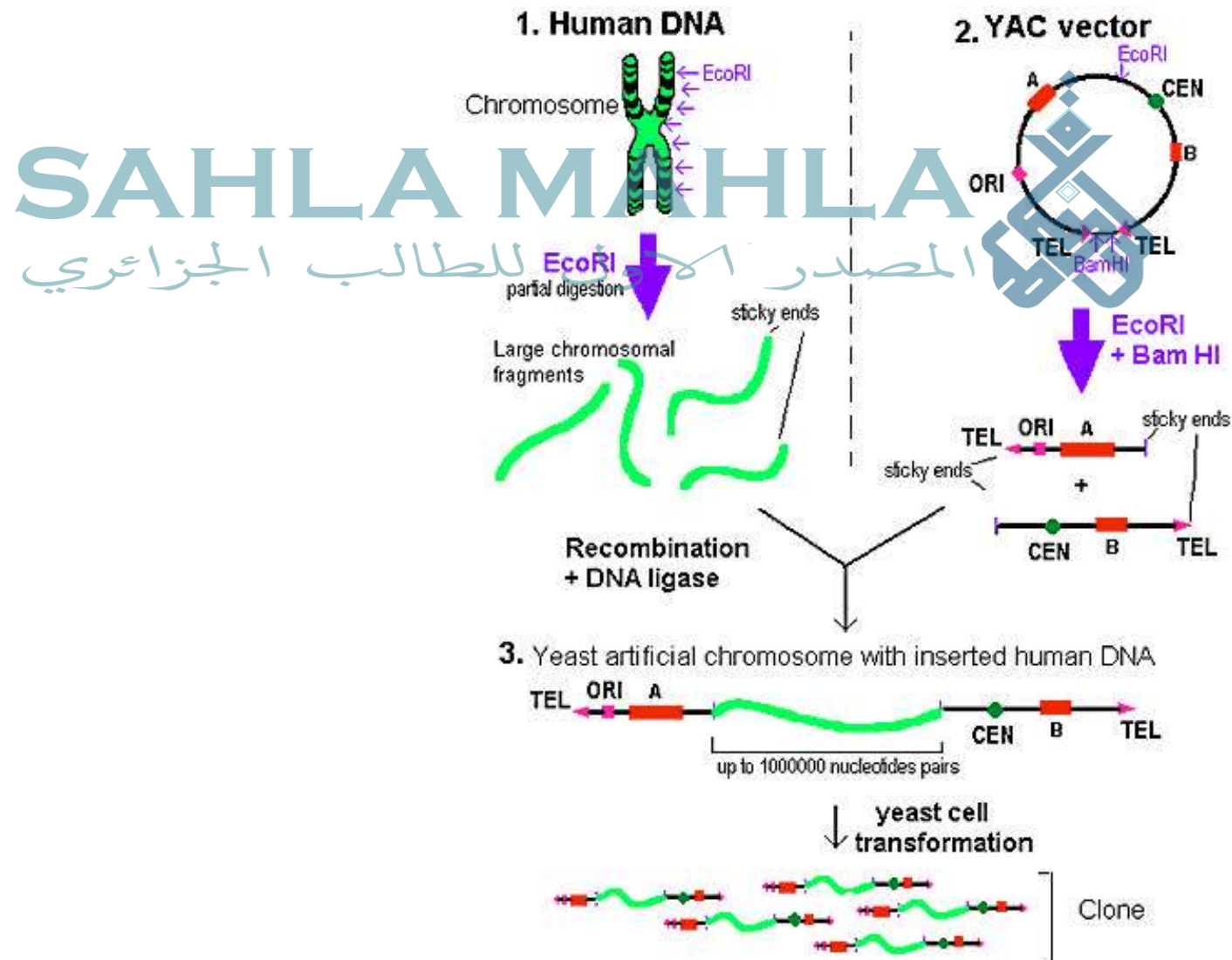
Les phages comme vecteurs de clonage



Les cosmides comme vecteurs de clonage



Les YACs comme vecteurs de clonage



Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

- Les cellules hôtes

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

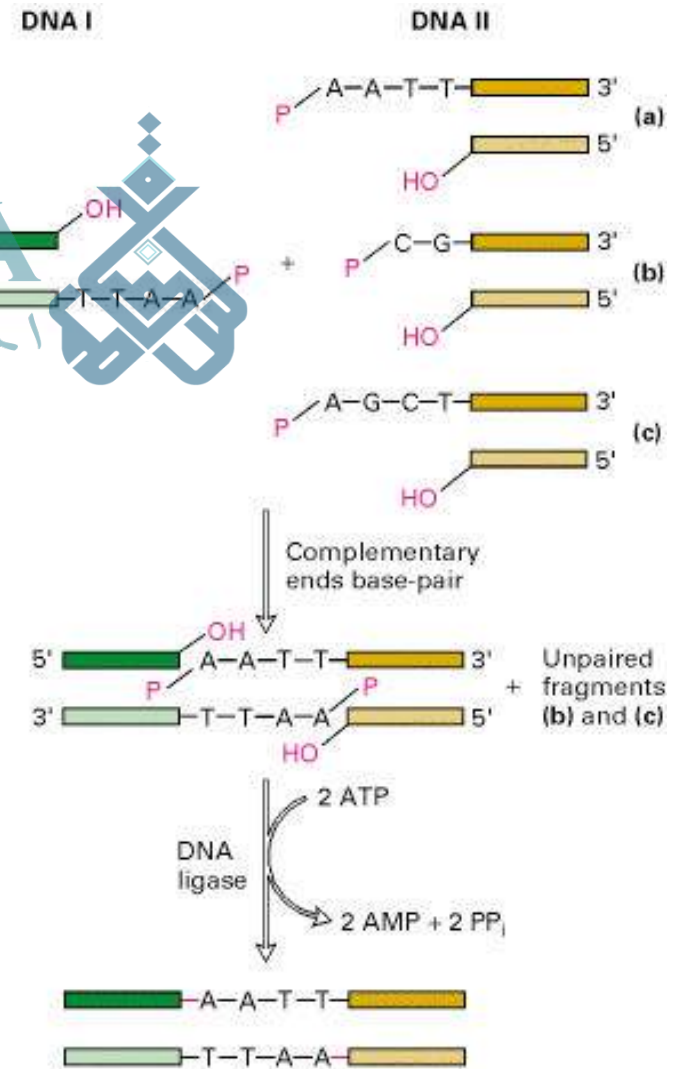
- Les intérêts du clonage?

La ligation

SAHLA MAHLI

المصدر الاول للطالب الجزائري

Une enzyme, la ligase, est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.



Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

- **Les cellules hôtes**

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

- Les intérêts du clonage?

Les cellules hôtes

Quelles types de cellules connaissez vous?

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

- Les cellules hôtes

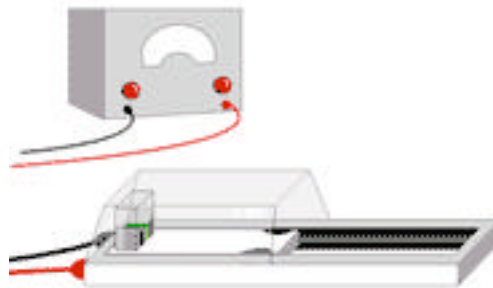
- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

- Les intérêts du clonage?

Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique:

Cas d'un vecteur plasmidique: l'ADN est introduit dans les bactéries traitées spécialement le plus souvent par choc thermique ou par choc électrique.

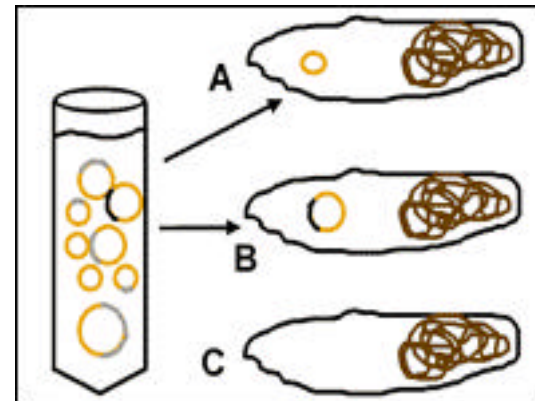
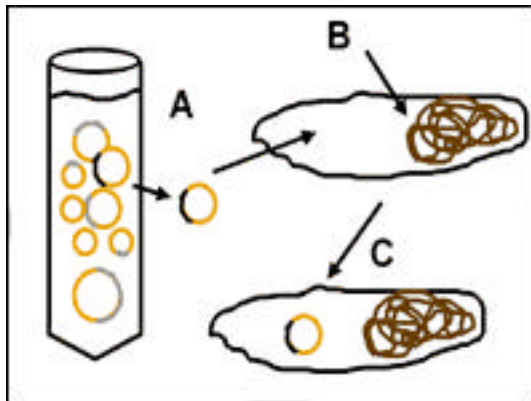


Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique:

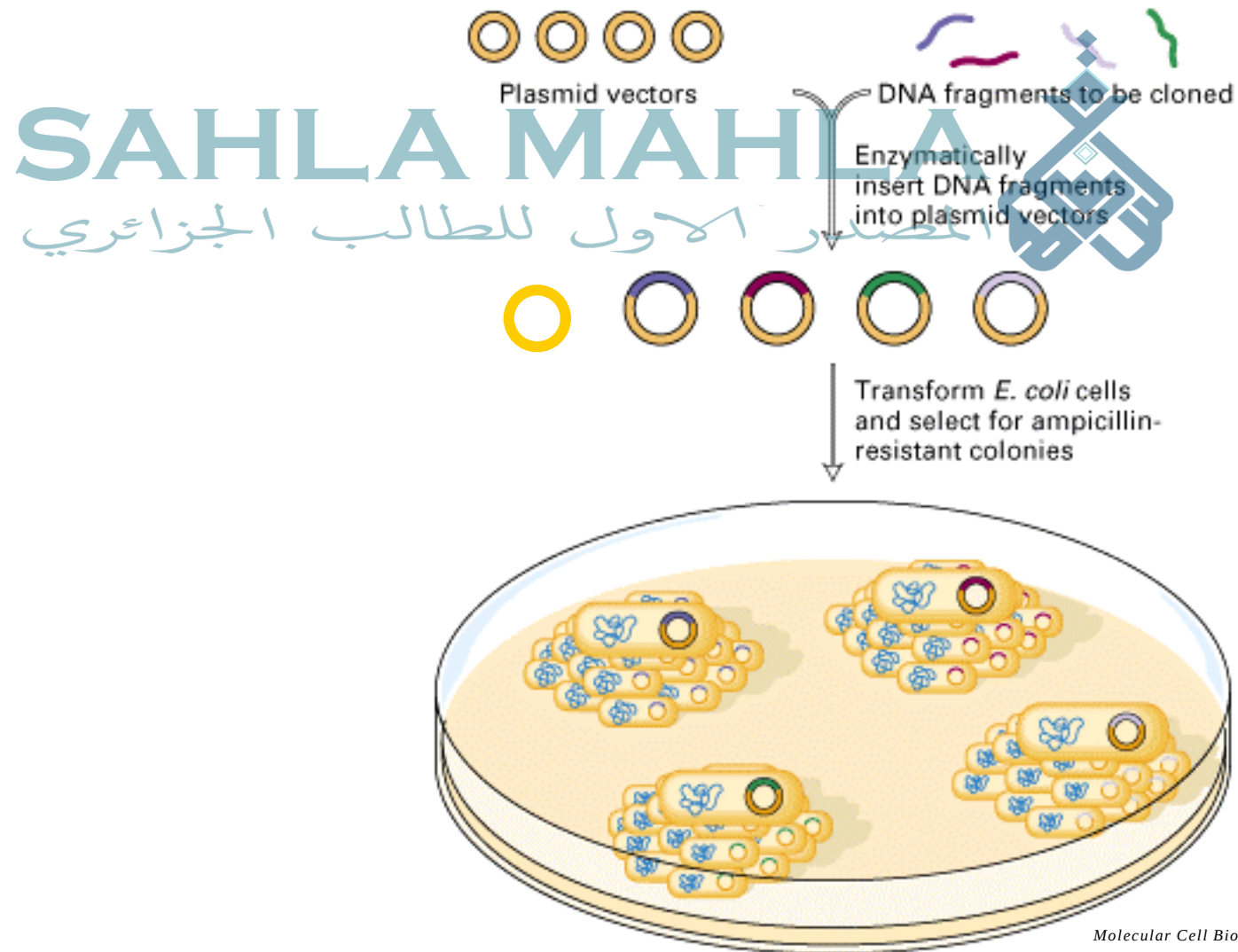
Cas d'un vecteur plasmidique:

SAHLA MAHLA
المصدر الاول للطالب الجزائري



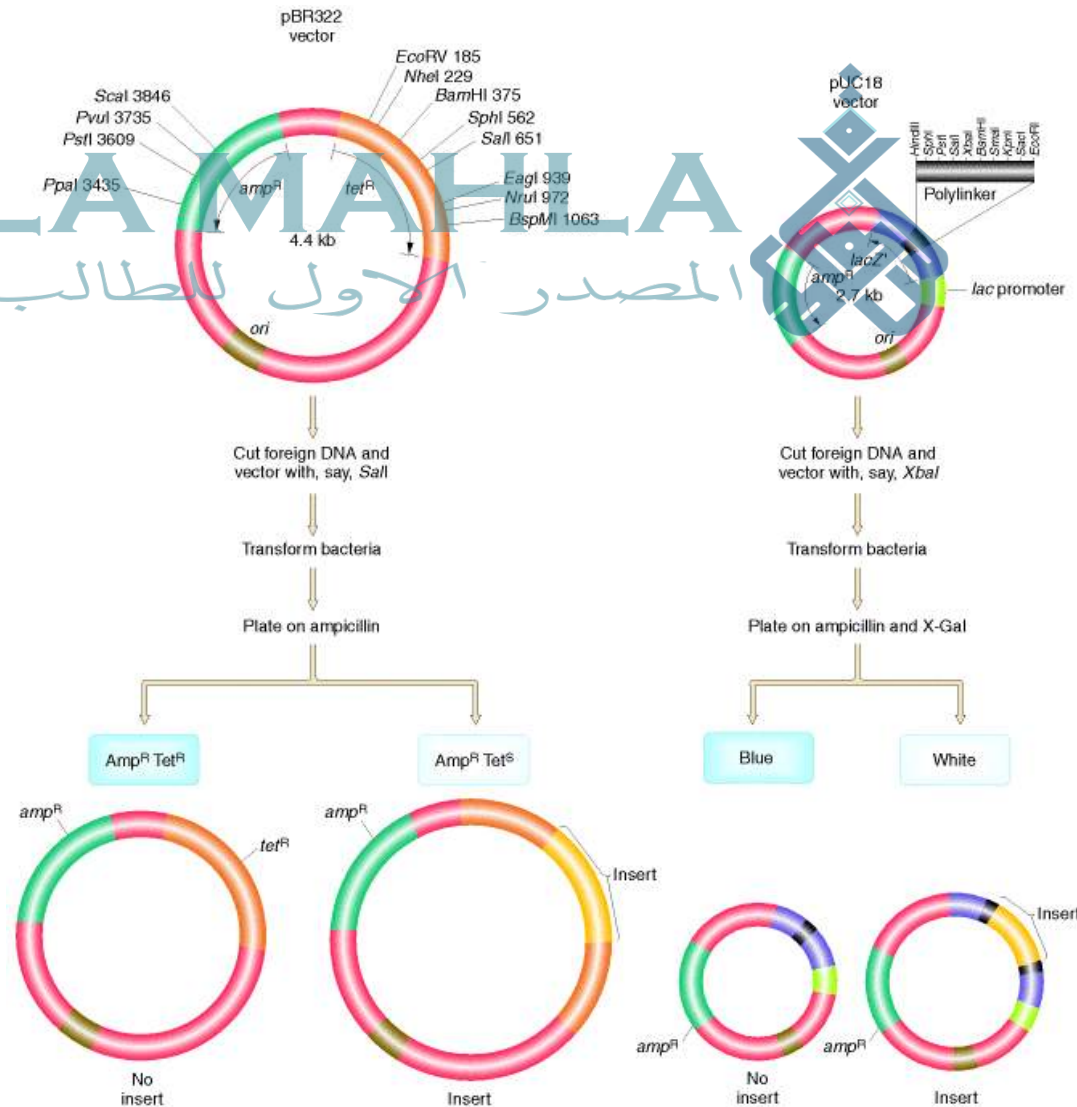
Sélection des clones intéressants

Dans ce cas les bactéries transformées avec le vecteur ne possédant pas et possédant l'insert sont sélectionnées.

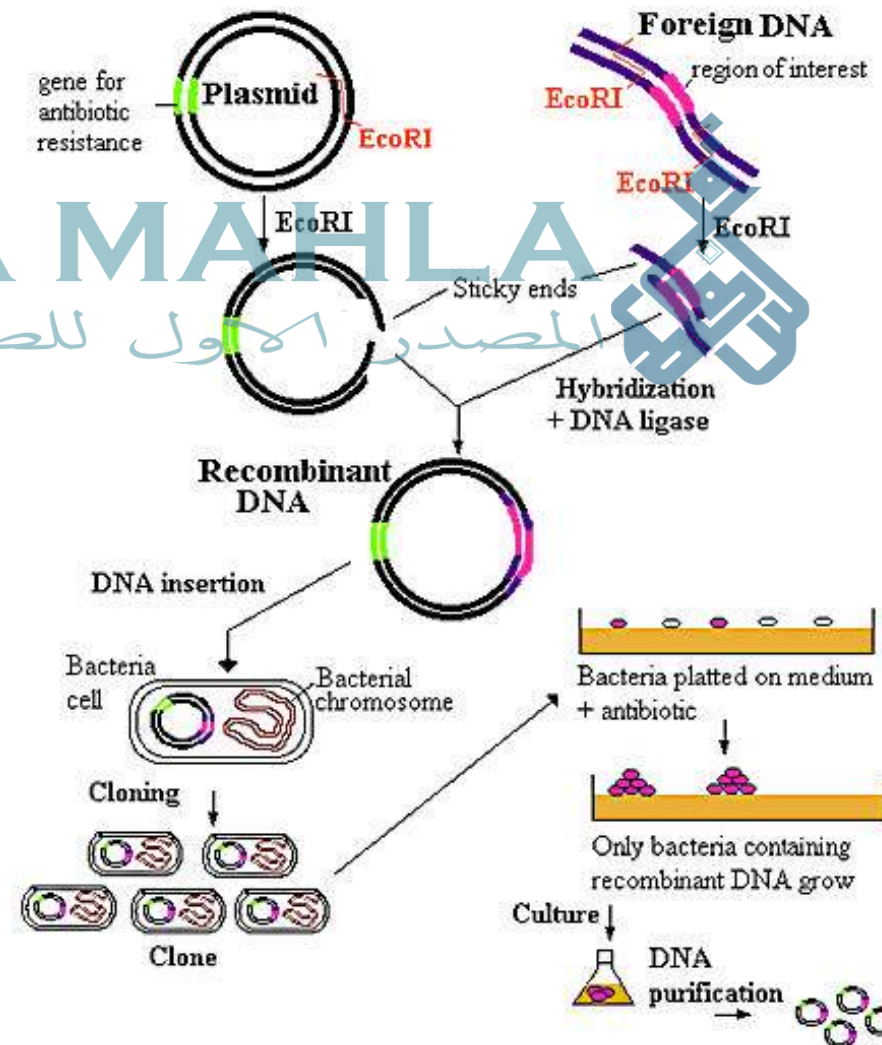


Sélection des clones intéressants

Dans ces deux cas pouvez vous différencier les clones intéressants?



Procédure complète



Cloning into a plasmid

Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

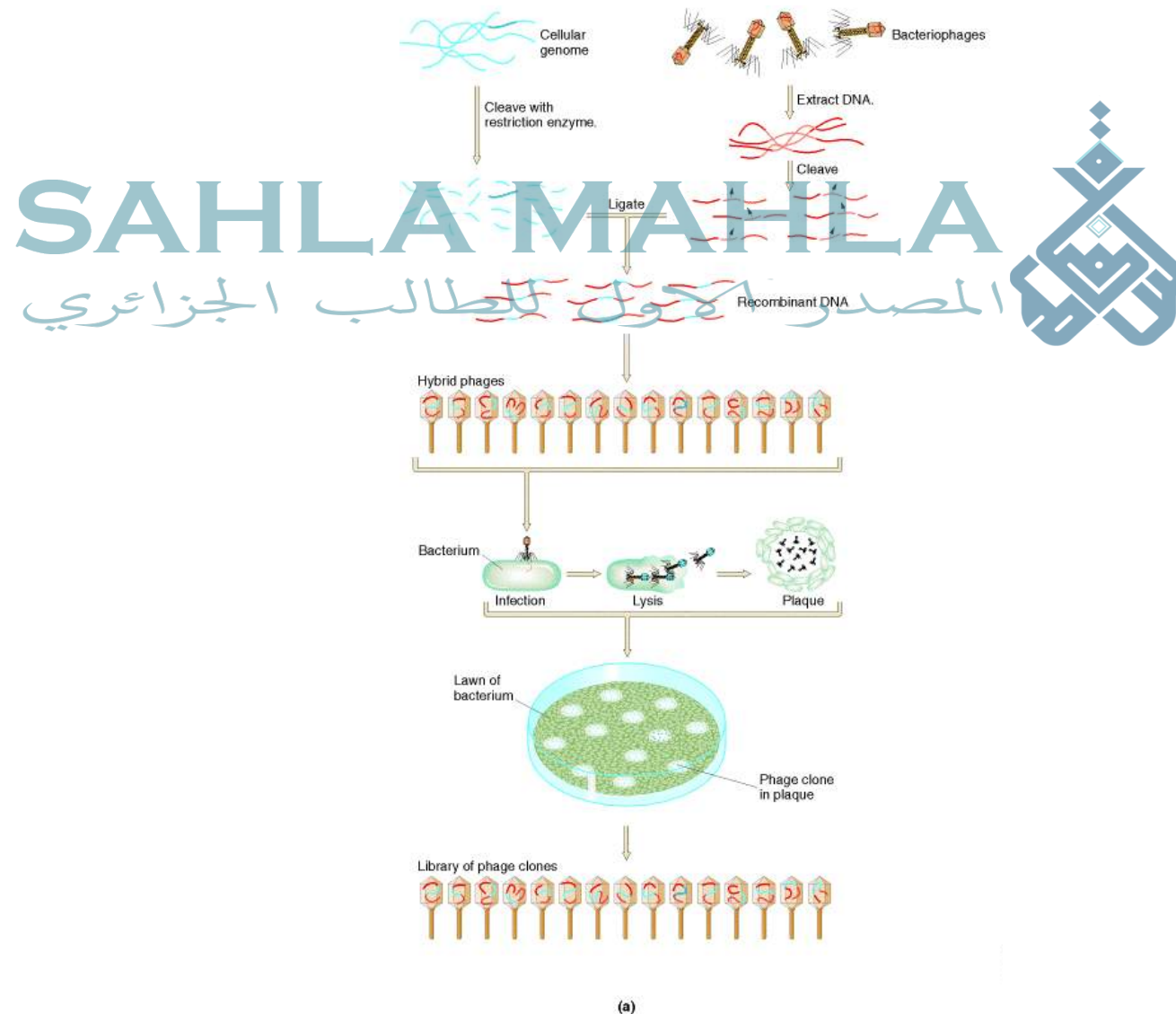
De type procaryotique:

Cas d'un vecteur plasmidique

Cas d'un vecteur phagique:



Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes



Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique:

Cas d'un vecteur plasmidique

Cas d'un vecteur phagique



De type eucaryotique:

A votre avis?

Questions?

- Comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur ?

Quelles informations porte cet ADN?

Comment sélectionner le fragment d'ADN voulu?

- Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction?

- Quels sont les vecteurs de clonage?

- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?

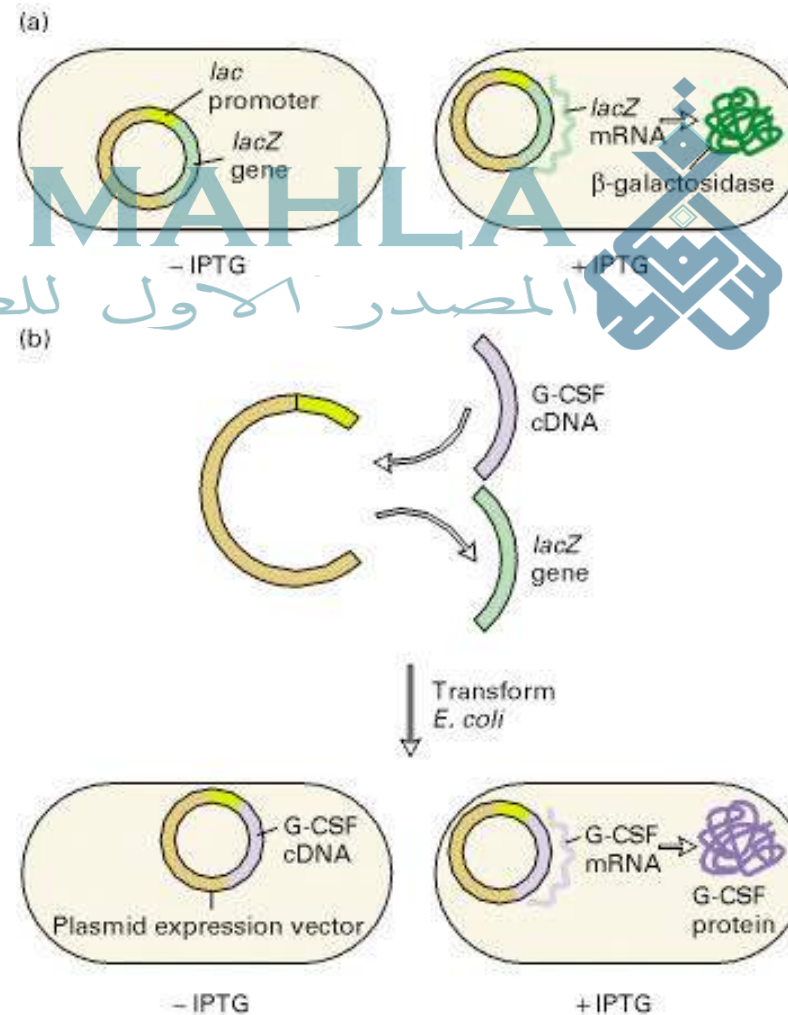
- Les cellules hôtes

- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte et comment celle-ci se multiplie?

- Les intérêts du clonage, quelques exemples?

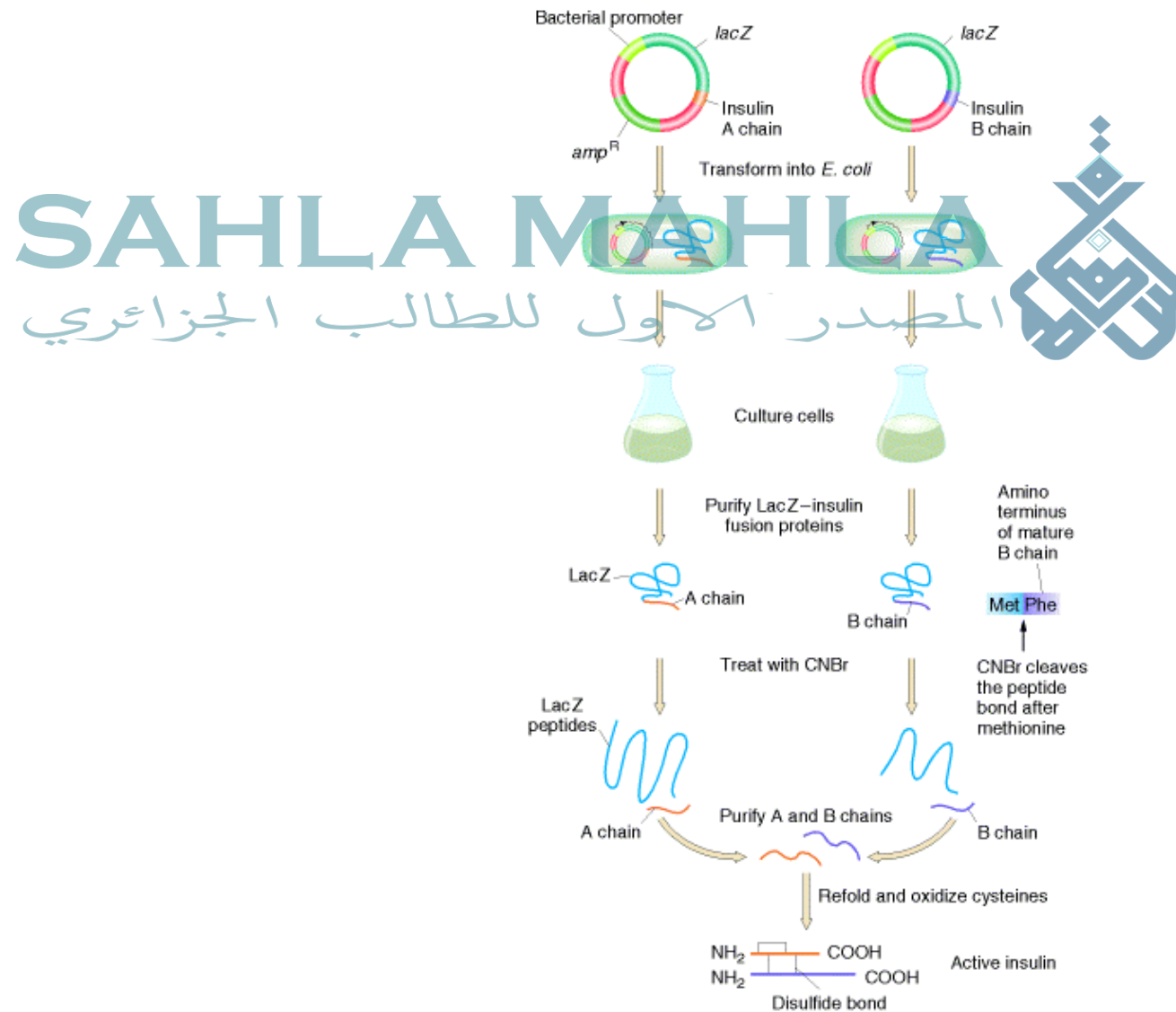
Production de protéines

Utilisation de vecteur d'expression

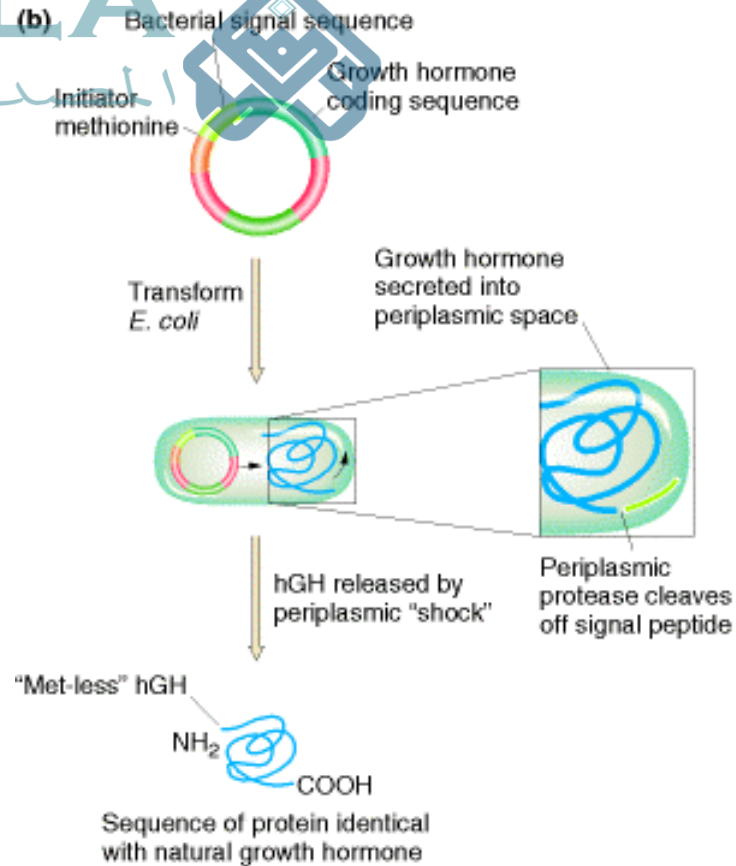
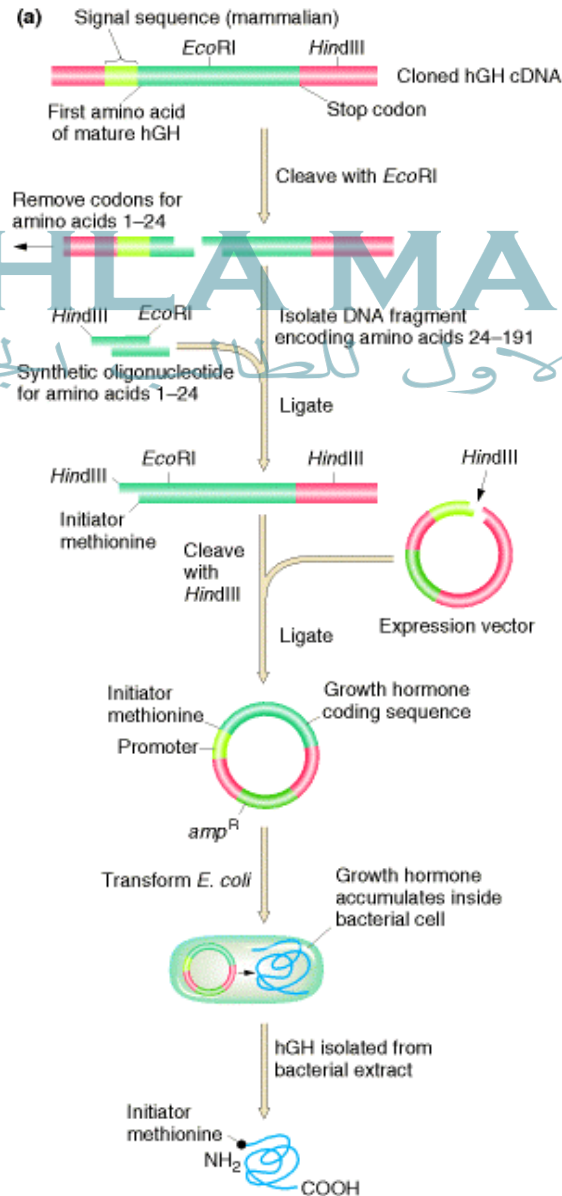


Quelles types de protéines cherchiez vous à produire?

Exemple de l'insuline



Problème de la maturation protéique



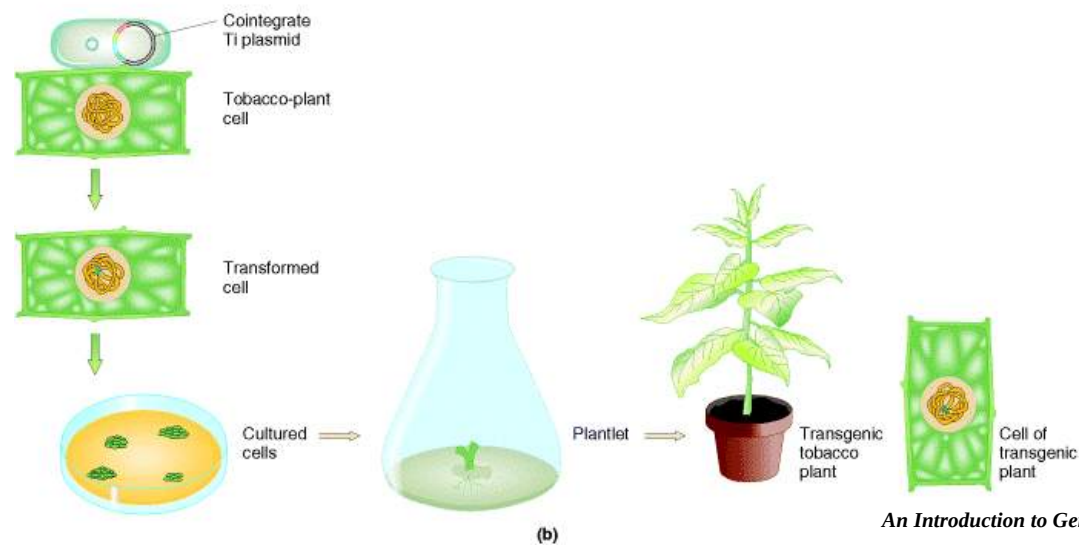
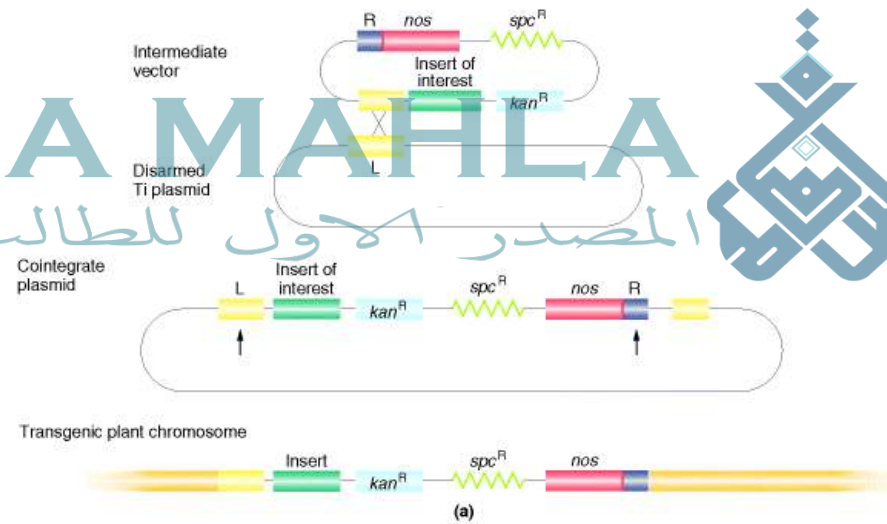
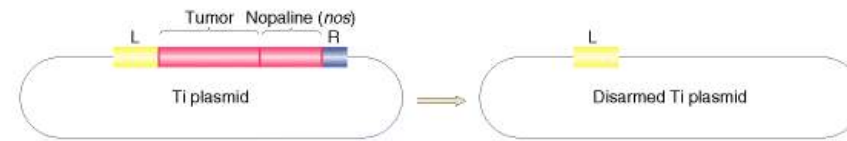
Problème de la maturation protéique

SAHLA MAHLA

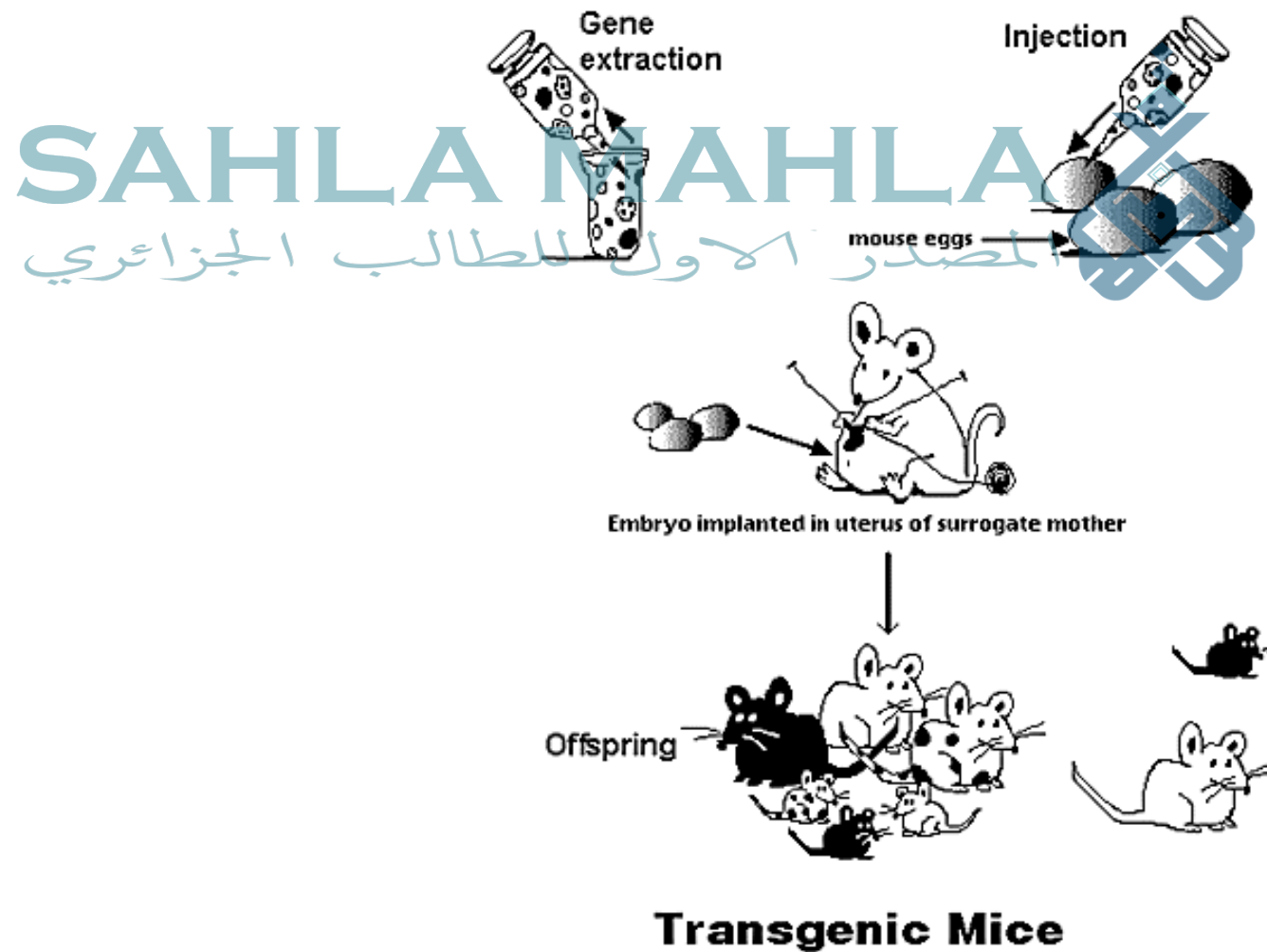


Que suggérez vous pour passer outre ce problème?

Création de plantes transgéniques



Création d'animaux transgéniques





Des questions?

Licence d'Informatique Année 2001-2002

Option: Introduction à la biologie moléculaire

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Banques d'ADN

Banques d'ADN

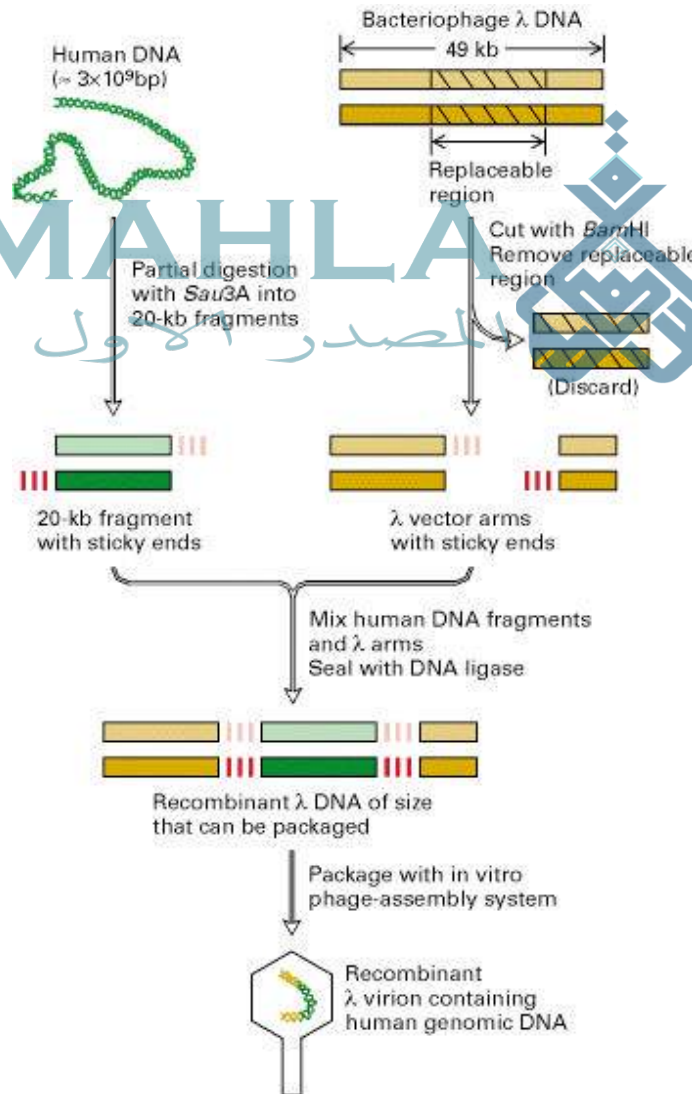
SAHLA MAHLA

المصدر المأثور للتراث العربي

Que chercheriez-vous à cloner?



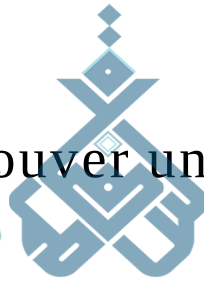
Banque d'ADN génomique



Comment définir si une banque est suffisamment grande pour espérer trouver un fragment d'intérêt?

SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب المحامي

Calcul afin de définir la probabilité de trouver une séquence donnée en fonction de:



Quels peuvent-être à votre avis les facteurs à prendre en compte pour ce calcul?

Comment définir si une banque est suffisamment grande pour espérer trouver un fragment d'intérêt?

Calcul afin de définir la probabilité de trouver une séquence donnée dans une banque.



$$P=1-(1-f)^N$$

f est fonction de la taille du génome, de sa complexité et de la taille du fragment cloné.

N est le nombre de colonies

Cette formule n'est valable que si la taille du fragment x à isoler est petite en comparaison de la taille L du fragment qui est cloné dans le vecteur de clonage.

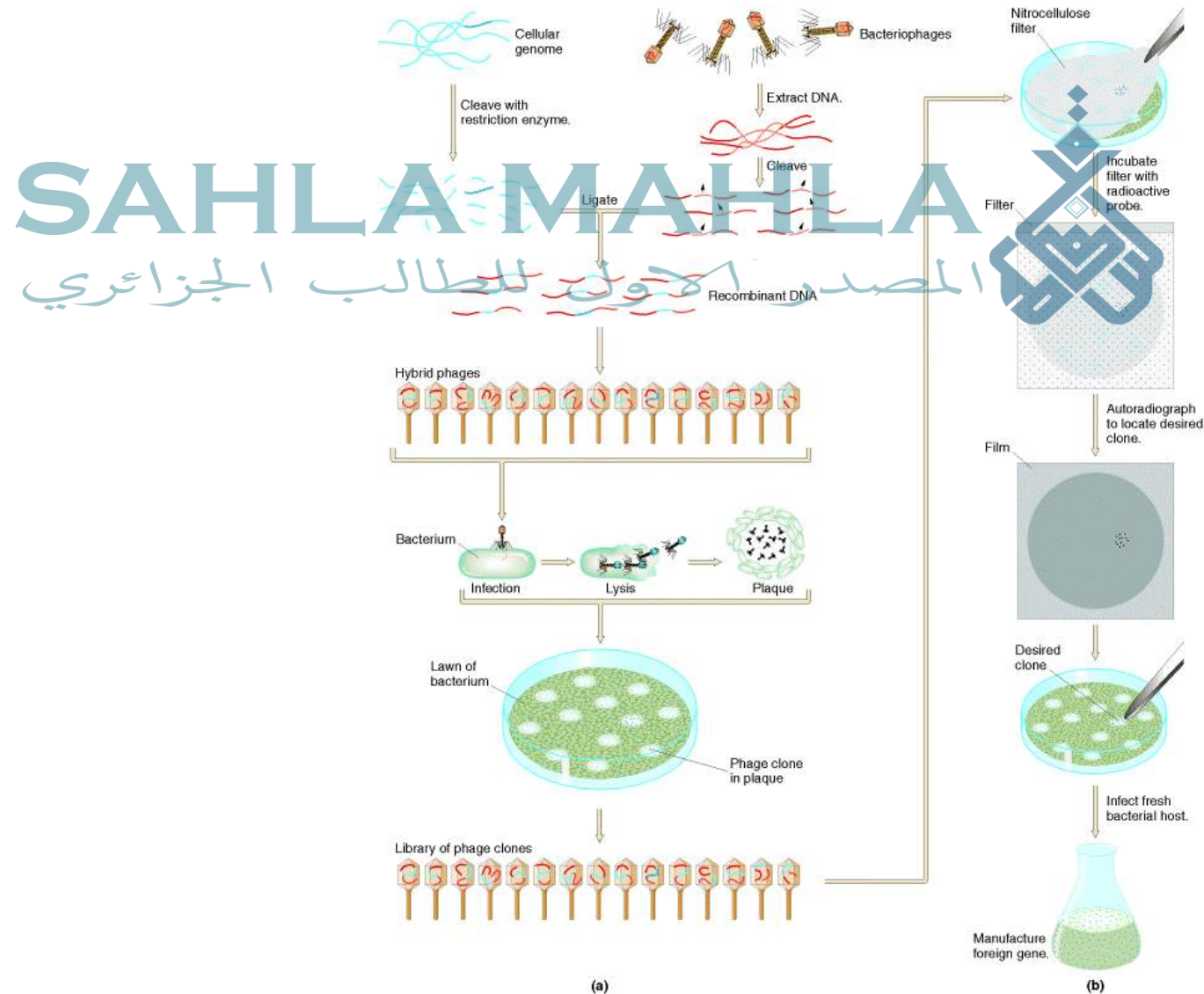
Sinon il faut utiliser une valeur corrigée

$$f' = f(1 - x/L)$$

Taille de différentes banques

Source d'ADN	Taille moyenne des fragments d'ADN clonés	N:nombre de colonie		
		P=0.90	P=0.95	P=0.99
E.coli	$8,5 \cdot 10^6$	720	940	1440
Yeast	$1 \cdot 10^7$	2300	3000	4600
Drosophile	$1 \cdot 10^7$	23 000	30 000	46 000

Criblage d'une banque phagique

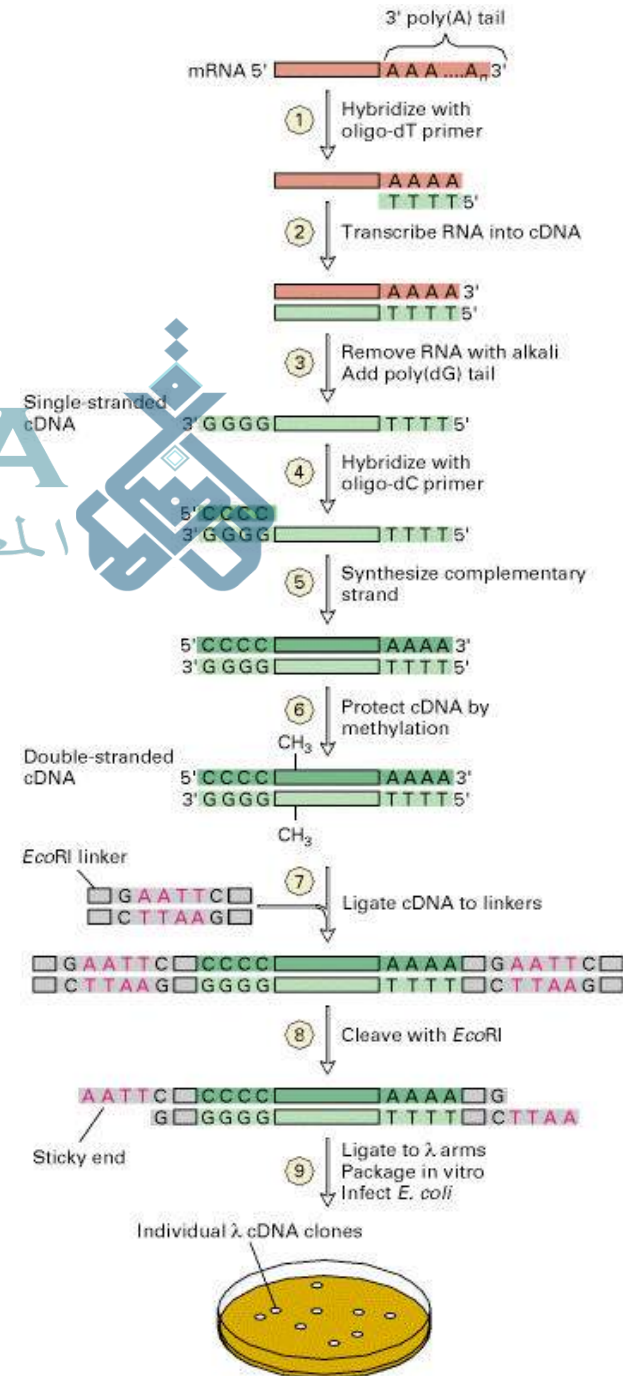


Banque d'ADNc

SAHLA MAHLA
المصدر الاول للطالب الجزائري

Le problème ici est
l'obtention de clone dit
full lenght.

Quel est le matériel de départ?



Exemples de démarches à suivre afin d'isoler un gène

Que proposeriez-vous?

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Exemples de démarches à suivre afin d'isoler un gène

Dépend du matériel de départ:

• Si séquence régulatrice: criblage d'une banque d'ADN génomique puis une banque d'ADNc

• Si séquence codante: criblage directement d'une banque d'ADNc

Références

• **Griffiths**, Anthony J.F., **Miller**, Jeffrey H., **Suzuki**, David, **Lewontin**, Richard C., **Gelbart**, William M., *An introduction to genetic analysis*, 7/e, 2000, W.H. Freeman.

Chapitre 12 et 13

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=iga>

• **Lodish**, **Berk**, **Zipursky**, **Matsudaira**, **Baltimore**, **Darnell**,
Molecular Cell Biology

Chapitre 7

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=mc_b.TOC