

Les vecteurs

1. Généralités sur les vecteurs.

1.1 Concept de vecteur

La purification des protéines et l'étude de leurs fonctions est un travail le plus souvent d'une extrême complexité, bien que ces molécules possèdent des propriétés spécifiques et qu'elles soient présentes dans chaque cellule à un nombre élevé de copies, cela les oppose aux gènes qui sont le plus souvent en un seul exemplaire par génome haploïde, qui ne possèdent aucune spécificité physicochimique ou biologique propre, qui sont le plus souvent morcelés et disséminés au sein d'un immense continuum moléculaire. La purification et l'amplification d'un gène ne peuvent s'effectuer que par sélection clonale moléculaire.

Pour cela le génome ou une de ses parties doit être coupé en morceaux, chacun étant intégré dans un DNA appelé **vecteur** qui permettra l'introduction et la multiplication de la séquence dans une bactérie, ultérieurement sélectionnée puis amplifiée.

Il n'existe pas de vecteur universel, le choix se fait en fonction des objectifs poursuivis et de la taille de l'acide nucléique à manipuler, les utilisations principales des vecteurs sont :

- le clonage et l'amplification d'une séquence de DNA.
- l'étude des mécanismes de l'expression d'une séquence de DNA.
- l'introduction du gène dans des cellules (transfection) ou des organismes (animaux transgéniques)
- La production des RNA.
- A l'échelle industrielle, la production des protéines à partir de leurs gènes.

Toute la puissance d'un vecteur résulte de sa construction, c'est à dire des séquences qui lui ont été apportées et qui lui confèrent des propriétés particulières. Depuis les premiers vecteurs naturels (plasmides bactériens, phage lambda) utilisés pendant les années 1970, des progrès considérables ont été accomplis dans la construction de vecteurs artificiels de plus en plus ingénieux et performants.

1.2 Propriétés que doit posséder un vecteur

- Il doit se répliquer activement dans la cellule hôte, indépendamment du DNA de la cellule hôte.
- Sa taille doit être la plus petite possible, permettant ainsi d'insérer une plus grande quantité de DNA, de manipuler plus facilement les recombinants et d'obtenir rapidement une plus grande quantité de copies par cellule hôte.
- Il doit posséder des propriétés permettant de sélectionner de manière simple les cellules qui l'ont incorporé.
- Sa présence doit perturber le moins possible la cellule hôte.
- Il doit être stable dans l'hôte sans y être modifié, quel que soit le nombre de générations.

- Il doit posséder le plus possible de sites uniques de coupure par des enzymes de restriction pour faciliter les constructions. Il est, de plus, souhaitable que certains de ces sites soient localiser dans des gènes de sélection afin que l'intégration du DNA étranger facilite l'isolement du recombinant

- Il doit être facile à isoler sous forme absolument pure

1.3 Principes généraux d'utilisation d'un vecteur :

A) Préparation du vecteur :

Avant son utilisation le vecteur doit être coupé à l'endroit exact où l'on désire insérer la séquence à amplifier, purifier ou étudier, cette coupure est effectuée par une enzyme de restriction, les extrémités ainsi libérées devront être traitées en générale avec la phosphatase alcaline de telle sorte que le vecteur ne puisse plus se refermer sur lui-même, seul le DNA à insérer permettant le raboutage.

B) Préparation du DNA à insérer :

Sa taille, et dans certain cas, ces extrémités doivent être rendues compatible avec ce que le vecteur capable d'accepter. Les DNA trop longs ou trop courts doivent donc être éliminés ou modifiés. Leurs extrémités doivent être compatible avec celles du vecteur où ils seront insérés.

C) Réalisation du recombinant :

Les deux préparations précédentes (vecteur et DNA à insérer) sont mélangées avec des proportions définies pour chaque type de recombinaison, en présence d'une **ligase** qui permet la ligation entre les extrémités du vecteur et celles du DNA à insérer. Le recombinant est purifié par extraction et précipitation.

D) Incorporation à l'hôte :

Pour se répliquer le vecteur doit être incorporé dans une cellule hôte. La procédure est spécifique de chaque type de vecteur. Une étape intermédiaire comme l'empaquetage (packaging) dans une capsid de bactériophage peut être nécessaire (Empaquetage : opération consistant à introduire un vecteur recombiné (phage ou cosmide) dans une capsid phagique reconstituée *in vitro* à partir de ses protéines.).

E) Choix de l'hôte :

Le choix de l'hôte dépend principalement du vecteur utilisé. Sauf cas particulier où l'on a intérêt à utiliser un hôte spécial, on s'adresse toujours au même type de cellule, dont il existe deux grandes catégories : les hôtes bactériens et les hôtes eucaryotes :

Les hôtes bactériens :

Ils sont utilisés le plus souvent possible car ils se multiplient rapidement (temps de génération :20 à 30 minutes), sont faciles à manier et peu onéreux. Les bactéries utilisées sont non pathogènes et affaiblies afin de diminuer les risques de dissémination accidentelle. La bactérie presque constamment choisie est *E. coli* - **Sauf cas exceptionnel** - le choix se porte sur des souches *E. coli*

res (-), c'est à dire restrictions négatives afin que le DNA inséré ne soit pas détruit par les enzymes de restriction bactériennes, les souches sont aussi souvent choisies **recA (-)** de manière à éviter tout phénomène de recombinaison au sein du DNA inséré ou entre le DNA inséré et le DNA bactérien (dépourvues de protéine **RecA** qui permettrait l'association entre deux séquences homologues lors du phénomène de recombinaison).

Enfin certaines expériences nécessitent des bactéries présentant un phénotype particulier. Par exemple, afin de distinguer les bactéries qui ont incorporé un plasmide recombinant des bactéries ayant incorporé un plasmide vide, on utilise souvent un système de coloration bleu/ blanc.

Cette coloration différentielle résulte de perte d'une activité β galactosidase dans les plasmides qui ont incorporé un insert, il faut impérativement utiliser dans ce cas des souche **lac -**, lesquelles doivent être conservées sur un milieu spécial, afin de diminuer l'apparition de révertants **lac+**.

Les hôtes eucaryotes :

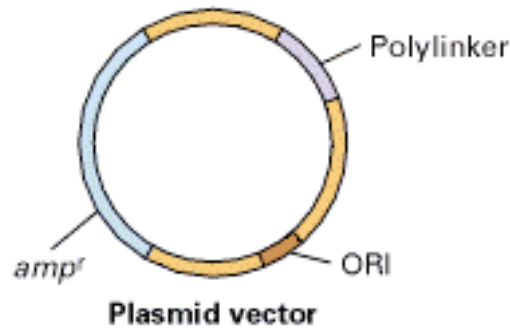
Ils peuvent être des cellules animale en culture , des levures ou des plantes, leur maniement est complexe et couteux, ils ne sont utilisés qu' en cas d'absolue nécessité, c'est à dire lorsque l'on travaille avec des vecteur ayant une origine de répllication eucaryotique, lorsque l'on veut étudier une régulation *in vivo* de gène eucaryote, ou lorsque l'on veut faire exprimer une protéines qui pour être fonctionnelle, doit subir des modification poste traductionnelle comme des glycosylation que les bactéries sont incapable de réaliser.

2. Les plasmides

Les plasmides sont de petits fragments de DNA circulaire extrachromosomique d'origine bactérienne. Leur répllication est complètement indépendante de celle du chromosome bactérien, une bactérie peut en posséder un très grand nombre de copies (plusieurs centaines). Ils sont transférables d'une bactérie mâle (F+) à une bactérie femelle (F-) lors de la conjugaison.

Leur taille est comprise entre 2 et 5 kb. Ce type de vecteur peut recevoir jusqu' à 8 ou 9 kb de DNA exogène, en règle générale, plus un plasmide est petit, plus il se réplique vite et plus la bactérie peut en posséder un nombre élevé de copies. Un plasmide ne contient donc qu'un très petit nombre de gènes qui confèrent à la bactérie des propriétés supplémentaires comme la résistance aux antibiotiques

Une bactérie peut posséder en même temps plusieurs plasmides différents, sauf si elle possède de certains gènes qui rendent leur cohabitation incompatible avec sa survie.



2.1. Utilisation des plasmides

Obtention d'une grande quantité de plasmides :

L'amplification

Cette technique s'utilise aussi bien pour produire une grande quantité de plasmides avant recombinaison que pour obtenir une grande quantité d'un recombinant cloné. Les bactéries contenant le plasmide sont cultivées dans un grand volume (500 ml à 2 L). Quand la densité bactérienne atteint environ $2,5 \times 10^8$ bactéries /ml, du chloramphénicol peut être ajouté afin de bloquer la croissance bactérienne sans affecter la réplication du DNA plasmidique. La paroi bactérienne est perméabilisée par un traitement au lysozyme suivi par un traitement avec un détergent (SDS) en milieu alcalin (soude). Grâce à ce traitement les RNA et le plasmide passent en solution. Cette solution porte le nom de **Lysat clair**, le DNA chromosomique reste emprisonné dans les restes bactériens.

Plusieurs techniques de purification du plasmide sont alors possibles suivant le degré de pureté requis. La technique la plus simple consiste à détruire les RNA, avec la RNAase A, l'enzyme et les protéines bactériennes sont ensuite éliminées par extraction phénolique. Le plasmide enfin récupéré par précipitation éthanolique et repris dans du tampon.

Pour obtenir du DNA particulièrement pur il faut utiliser l'ultracentrifugation, qui se pratique en gradient de chlorure ou de sulfate de césium en présence de bromure d'éthidium. Le plasmide sédimente sous forme une bande localisée vers le milieu du tube que l'on visualise par des UV. Les restes de DNA bactériens sont rassemblés en une bande qui sédimente moins vite. Le plasmide est récupéré par ponction à l'aiguille au travers de la paroi du tube, les sels de césium et le bromure d'éthidium sont éliminés par dialyse et une série d'extraction.

Cette approche a aujourd'hui été abandonnée, sauf cas exceptionnel, on utilise en générale des kits qui permettent de récupérer le DNA à partir du **lysat clair** par filtration au travers des membranes (gel- filtration ou affinité)

Quelle que soit la technique, s'il n'y a aucune incompatibilité entre la bactérie et le plasmide, le rendement est d'environ 500 ug à 2 mg de plasmide par litre de culture.

2.2. Préparation du plasmide pour la recombinaison

Pour insérer une séquence du DNA dans un plasmide, il faut d'abord l'ouvrir, cette ouverture est obtenue par une incubation du plasmide avec une enzyme de restriction. Il est impératif de choisir un enzyme qui ne possède qu'un site de coupure unique au sein du plasmide.

Le choix de l'enzyme étant fonction du DNA à insérer et de la stratégie choisie.

Les plasmides actuels contiennent tous un **polylinker**, qui est une courte séquence artificielle contenant un grand nombre de sites de coupure unique pour diverses enzymes de restriction.

Cela permet de disposer d'un large choix d'enzymes utilisables.

Avant de pouvoir être utilisable les plasmides linéarisés doivent être traités de telle sorte que leur fermeture sur eux-mêmes soit impossible, donc qu'ils ne puissent se refermer qu'en insérant un DNA étranger. Pour cela ils sont traités à la phosphatase alcaline qui déphosphoryle en 5'. Le plasmide ne peut alors se refermer que sur le DNA étranger qui lui est phosphorylé.

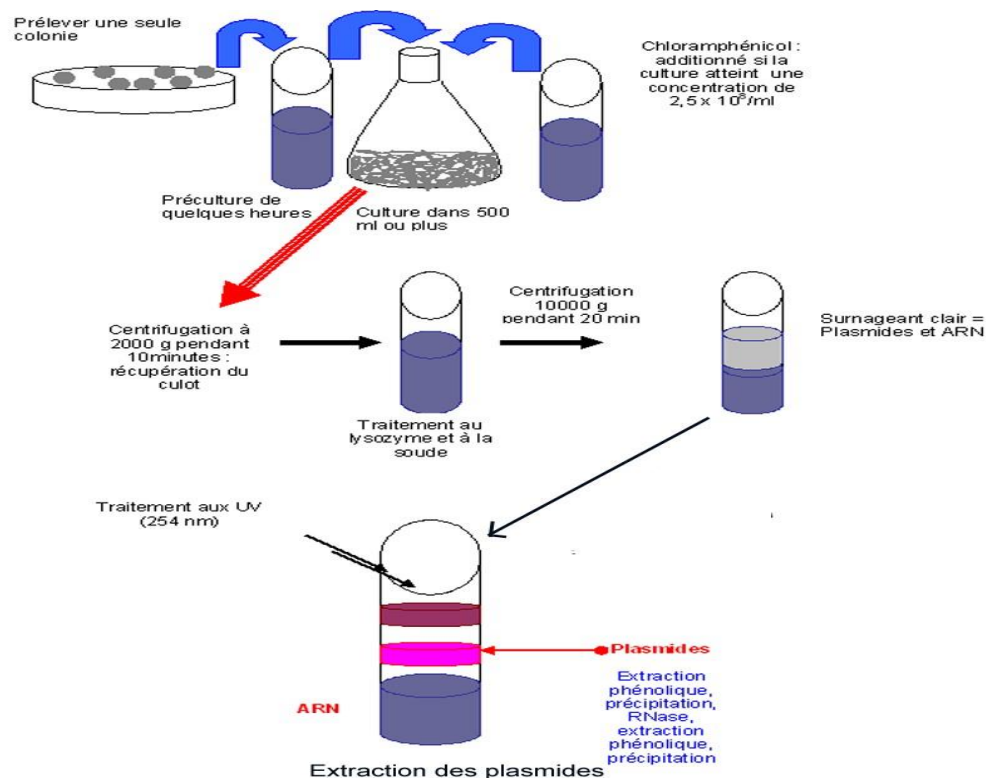


Figure : Extraction et purification de plasmides

Constitution de l'hybride

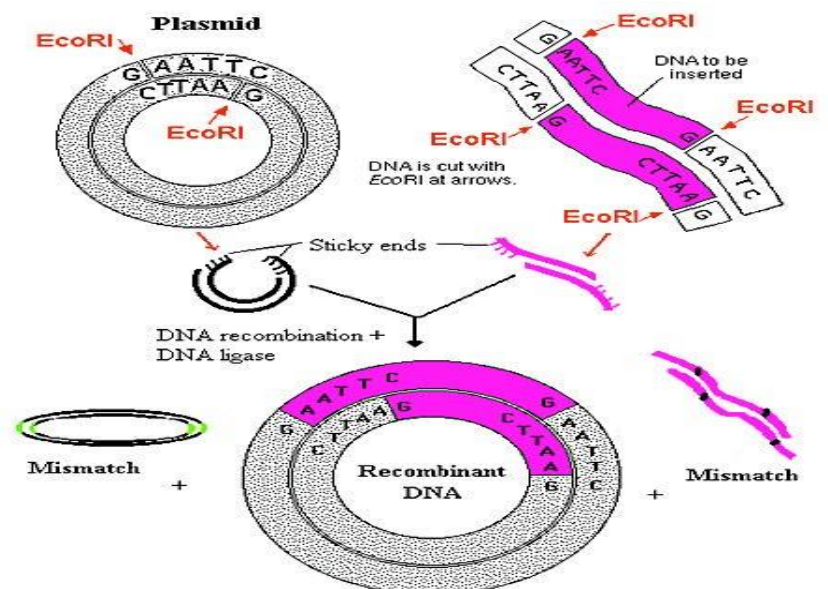
Au vecteur linéarisé et phosphatasé est ajouté le DNA à insérer et de ligase, l'incubation est conduite à basse température, ce qui permet aux extrémités cohésives de s'hybrider. Le DNA à insérer (8 à 9 kb maximum) doit être apporté en faible concentration par rapport au plasmide car cela favorise ainsi les association DNA à insérer / plasmide en minimise l'auto- association DNA à insérer / DNA à insérer.

Introduction du plasmide recombiné dans la bactérie

Cette étape porte le nom de **transformation bactérienne**, Les bactéries sont cultivées de manière classique en milieu liquide, puis sont rendues perméables aux DNA étrangers, cette perméabilité est obtenue par simple incubation à 0 C°, en présence de chlorure de calcium 50 mM.

Après une heure d'une telle incubation au froid, les bactéries sont capables d'incorporer un DNA étranger, on dit alors que les bactéries **sont compétentes**, les plasmides sont mis en contact avec les bactéries pendant une trentaine de minutes à 0 C°. On effectue ensuite un choc thermique à 37 C°, pendant 30 à 60 secondes suivant le volume de l'incubation, puis la culture est relancée et enfin étalée sur boîte.

Il est aussi possible d'utiliser l'électroporation pour introduire les plasmides dans les bactéries. Un choc électrique intense, mais très bref, entraîne des perforations de la paroi des bactéries qui deviennent ainsi perméables aux DNA exogènes et donc aux plasmides, ces perforations cicatrisent rapidement lorsque les bactéries sont remises en culture. Les rendements sont excellents, ce qui fait que cette approche est de plus en plus utilisée.



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Sélection des bactéries ayant incorporé un plasmide recombiné

Le rendement de transformation étant très faible (1 bactérie sur 10^5 à 10^7 par microgramme de plasmide recombinant), il convient de sélectionner les quelques bactéries recombinantes parmi les milliards de bactéries qui n'ont rien incorporé. Cette sélection est obtenue par culture sur un milieu sélectif, la ou les propriétés apportées par le plasmide étant utilisées comme moyen de sélection. Dans la pratique il s'agit presque toujours d'une résistance à un antibiotique. Les bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant deviennent, grâce au gène de résistance du plasmide, résistantes à l'antibiotique, toutes les autres sont tuées. Les clones bactériens retrouvés sur la boîte de culture correspondent chacun à une bactérie ayant incorporé un recombinant, et qui s'est multipliée. Il convient de noter que cette technique ne permet que de sélectionner les bactéries qui ont incorporé

un plasmide, elle ne permet pas de distinguer celles qui ont incorporé un plasmide recombinant de celles qui ont incorporé un plasmide vide. Pour y parvenir, il faut utiliser directement ou dans un second temps, **un second marqueur de sélection**. Dans la pratique, deux systèmes sont utilisés :

Système de second gène de résistance aux antibiotiques : le DNA étranger est inséré au sein de ce second gène de résistance pour un antibiotique. Cette insertion va se traduire par une inactivation de ce gène, donc par la perte de la résistance à cet antibiotique. Les bactéries qui ont incorporé un plasmide recombinant contenant un DNA inséré seront **résistantes** au premier antibiotique, mais sensibles au second. Par contre les bactéries qui auront incorporé un plasmide vide sans DNA inséré seront résistantes aux deux antibiotiques. Le système le plus classique associe dans le plasmide les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Cette approche n'est en générale plus utilisée pour les plasmides car elle est complexe que l'utilisation du système de l'opéron lactose.

Le système de l'opéron lactose :

La transformation de bactéries **lac⁻** par un plasmide contenant un gène **lac^Z** (β galactosidase) confère à cette bactérie le phénotype **lac⁺** qui peut être caractérisé directement au niveau des clones bactériens en utilisant un substrat chromogène. Pour cela les bactéries sont cultivées en présence de **IPTG** : **isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid** (inducteur non métabolisable de l'opéron lactose) et de **Xgal** (ou autre équivalent comme le bleu-Gal, ...), des galactosides dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand ils sont clivés par la β galactosidase. Sur un tel milieu de culture les bactéries **lac⁺** seront colorées en bleu puisqu'elles sont induites et qu'elles métabolisent le Xgal, par contre les bactéries **lac⁻** auront une coloration blanchâtre légèrement translucide, couleur habituelle des colonies bactérienne. L'insertion d'un DNA étranger au sein du gène **lac^Z** l'inactive et les colonies correspondantes restent blanches.

2.3. Les différents plasmides

2.3.1. Les plasmides de première génération

Ce sont les plasmides spontanément rencontrés dans la nature, qui furent utilisés pour les toutes premières expériences de génie génétique.

Il s'agit des plasmides **Col E1**, **RSF2124** et **pSC101**.

Ce type de plasmide étant loin de posséder les propriétés indispensables à la solution des problèmes complexes du clonage, les chercheurs ont d'emblée construit de nouveaux plasmides artificiels, en rassemblant en un **plasmide chimère**, les éléments intéressants de chaque plasmide naturel, et en augmentant le nombre de sites uniques de coupure par les enzymes de restriction.

2.3.2. Les plasmides de deuxième génération

Ils résultent des constructions décrites ci-dessus. Par conséquent, ils ne sont pas des plasmides naturels. La série la plus importante de ces plasmides est la série **pBR 312** à **pBR 322**, ce dernier est considéré comme étant l'exemple typique de cette génération, il est constitué de 4363 paires de

bases, dont la séquence nucléotidique est complètement connue. Il possède deux gènes de résistance aux antibiotiques, l'un pour la tétracycline (TC^R), l'autre pour l'ampicilline (Ap^R). Et 20 sites unique pour des enzymes de restriction. Parmi ces sites unique 11 sont localisées dans les gènes de résistance aux antibiotiques. L'insertion d'un DNA étrangère dans l'un quelconque de ces sites se traduit par la perte de la résistance à l'antibiotique correspondant. Le site le plus utilisé est le site Pst I d gène (Ap^R).

2.3.3. Les plasmides de troisième génération :

Un plasmide puissant et bien construit peut permettre de simplifier considérablement le travail. De nombreuse équipes ont construit une série de plasmides aux performances sans cesse croissantes. De nombreuse firmes de biotechnologies proposent maintenant dizaines de sortes de plasmides particulièrement sophistiqués. Dont les plus performants permettent d'obtenir des recombinant en quelques minutes.

Exemple : **la famille pUC** : ces plasmides de 2600 pb environ contiennent le gène de résistance à l'ampicilline de pBR322 et une partie du gène lacZ. Au sein de ce gène lacZ a été introduit un polylinker, c'est à dire une séquence polynucléotidique synthétique correspondant a toute une série de site uniques, successifs, de coupure par des enzymes de restriction.

Remarque 1 : pour profiter la possibilité d'utiliser le système (bleu/ blanc : gène lacZ et l'activité de B- galactosidase), il est impératif d'utiliser des bactéries **lac⁻**.

Remarque 2 : comme nous l'avons déjà indiqué, les industriels font des efforts importants d'imagination afin de fournir des plasmides de plus en plus performants qui facilitent le travail et accélèrent l'obtention des résultats. **Ce sont les plasmides de dernière génération.**

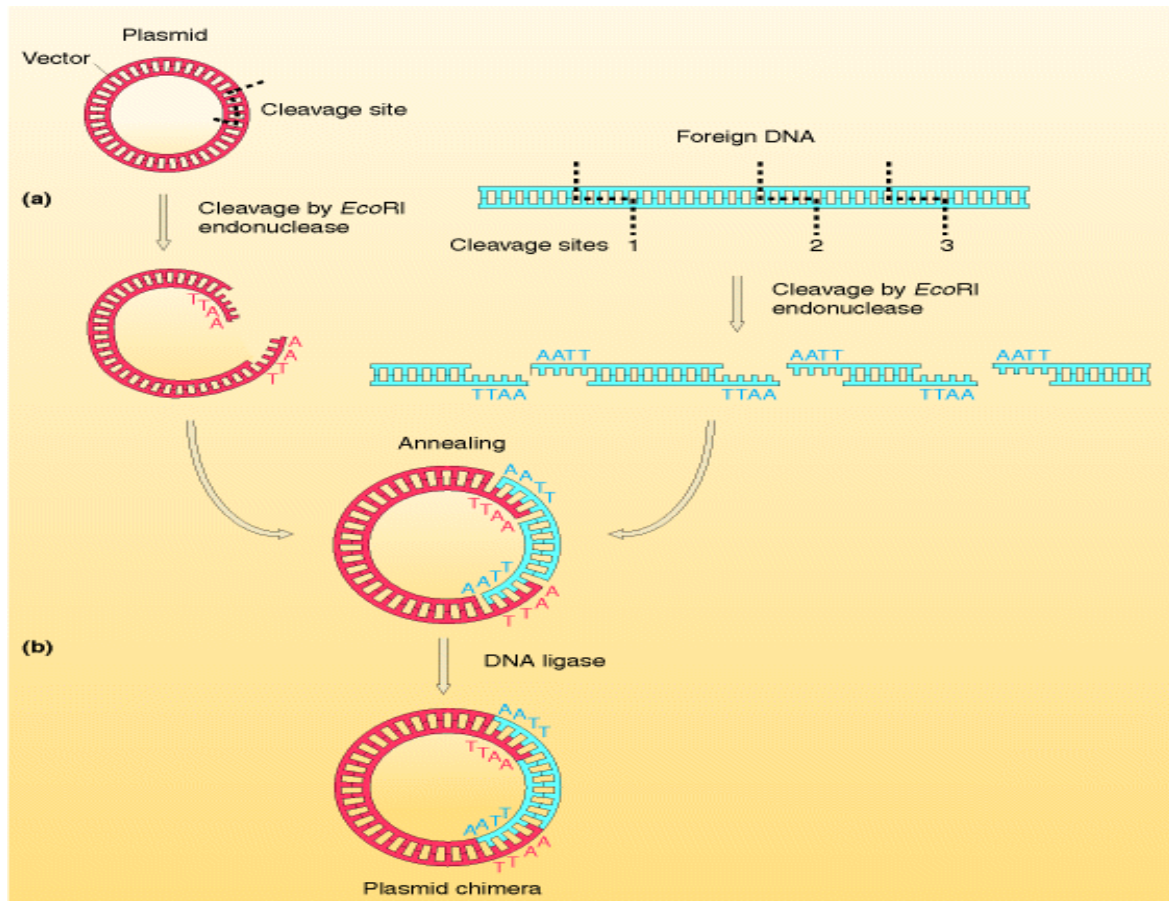
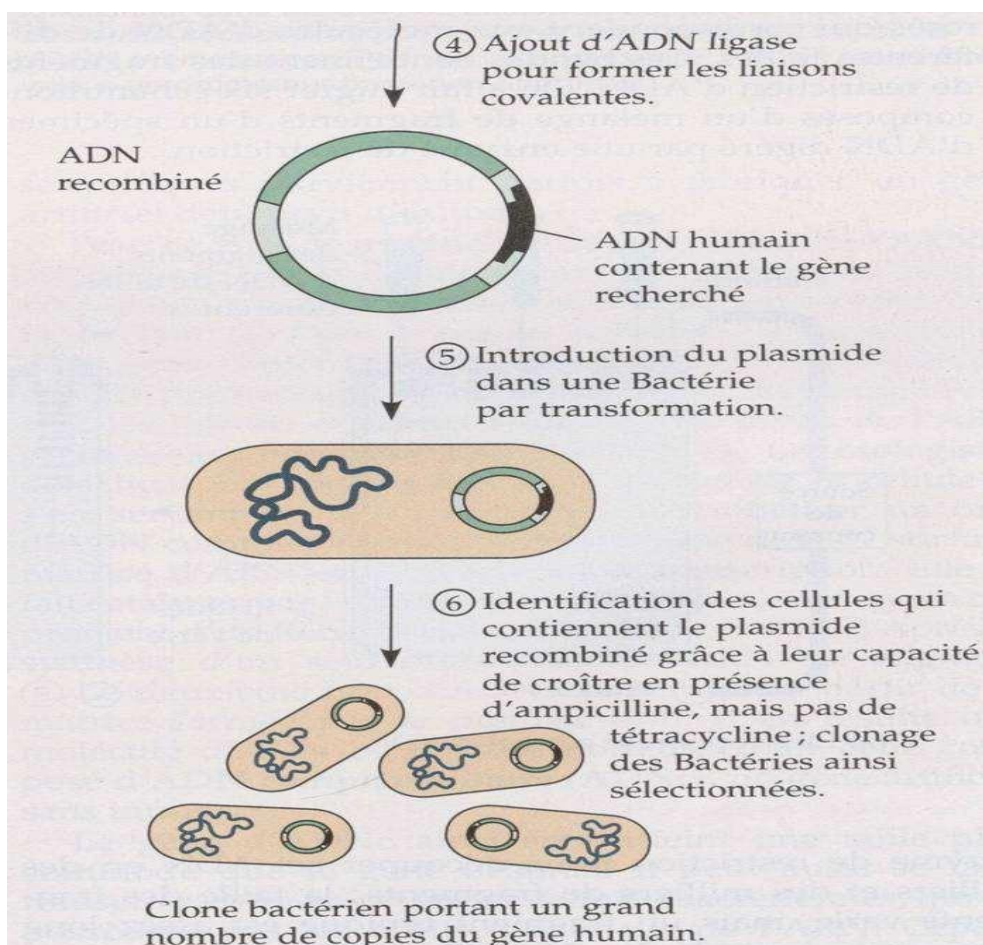
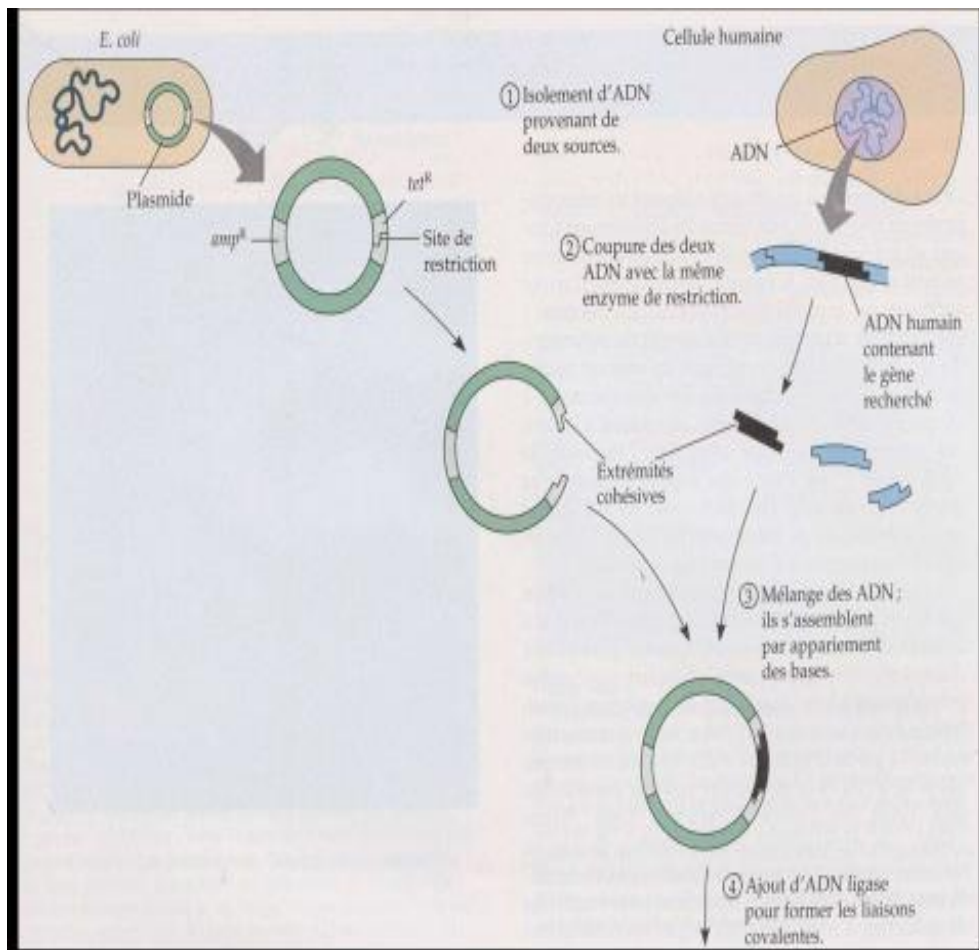


Figure : Obtention de l'ADN recombinant



3. Les phages

Les bactériophages ou les phages sont des **virus de bactéries**, leur multiplication est **rapide**, le **nombre de copies** par cellule est considérable. Ils sont munis d'un **système de pénétration** dans la bactérie et s'y multiplient de **façon autonome**. Le rendement de cette infection est très largement **supérieur** à ce qui obtenu lors de la transformation de la bactérie par les plasmides. La taille du DNA inséré est beaucoup **plus grande** que ce qu'il est possible d'insérer dans les plasmides, en revanche leur maniement est légèrement **plus complexe**. La prolifération du phage dans la bactérie se traduit à terme par **lyse**, dans les cultures en gélose les recombinant ne s'objectiveront plus par des colonies mais par plage de lyse sur un tapis bactérien.

3.1 Utilisation des phages

Obtention d'une grande quantité de phages

Comme les phages vont détruire les bactéries après infection, il convient de partir d'une plus grande quantité de bactérie que lors de la transformation par un plasmide. Les bactéries sont donc cultivées dans un milieu contenant du lactose (car le lactose active le gène *lamB* qui code le récepteur du phage λ jusqu'à densité de 4×10^8 par ml, récupérées par centrifugation, et remises en suspension dans un milieu neuf contenant du $MgCl_2$ 10 Mm (car le magnésium est indispensable pour la fixation du phage sur son récepteur). Le phage à amplifier est ajouté (environ 5×10^7 phage par ml de bactérie). Après adsorption du phage par les bactéries (5 min à 37 C), une culture à grande échelle est lancée, les bactéries sont infectées par le phage qui va se multiplier activement et finalement, provoquer un éclatement des bactéries hôtes. Après addition de chloroforme et de NaCl, les débris bactériens sont éliminés par centrifugation, les phages sont précipités puis purifiés par ultracentrifugation. Au cours de cette centrifugation les phages migrent en anneau de 2 à 3 mm d'épaisseur qui est récupéré par ponction à la seringue au travers de la paroi du tube. On obtient environ 10^9 à 10^{10} phage par millilitre de milieu de culture.

Contrairement aux plasmides, les phages ne sont pas constitués par du DNA nu mais par du DNA enfermé dans une capsid. Pour extraire le DNA des phages il faut d'abord procéder à une destruction des protéines de la capsid.

Titration des phages

Lorsque on travaille avec des phages il est indispensable d'en connaître la concentration approximative. Pour cela il faut les titrer. Des dilutions croissantes du phage sont ajoutées à des solutions de bactéries, après adsorption du phage, chacune des dilutions est coulée en gélose molle, sur une boîte de culture bactérienne. Après culture à 37 C, le nombre de **plage de lyse** est déterminé

dans chaque boîte où cela est possible, c'est à dire celles où les plaques ne sont pas confluentes. Le titre du phage en est déduit compte tenu de la dilution de départ correspondant à la boîte lue. Le résultat s'exprime en **pfu/ml** de solution de phage (pfu= plaque forming unit).

3.2. Préparation d'un phage pour la construction d'un recombinant

Deux stratégies sont utilisables : l'**insertion simple** et la **délétion – remplacement**. Le choix est presque exclusivement fonction de la taille du DNA à introduire. Certains phages cependant ne peuvent être utilisés qu'en insertion.

La technique d'insertion simple : le principe est identique à celui utilisé avec les plasmides. Le phage est coupé en un site unique où le DNA à cloner est inséré. Par cette technique, il est possible d'insérer jusqu'à **12kb**. Bien que le DNA des phages ne soit pas circulaire, la réalisation pratique est identique à celle décrite pour les plasmides. Le phage est coupé par une enzymes de restriction à site unique et les extrémités libérées sont phosphatasées pour empêcher la religation du phage sur lui-même lors de la construction des recombinant.

La technique de délétion – remplacement :

La partie centrale du phage, non indispensable à son cycle de vie est délétée et remplacée par le DNA à insérer, avec cette stratégie, il est possible d'insérer de 8 à 12 kb de DNA étranger.

La réalisation pratique est plus complexe que celle de l'insertion car il faut extraire la partie centrale du phage avant de pouvoir construire le recombinant.

(Les phages sont ligaturés pour donner des concatémères à couper par des endonucléases au niveau de la partie centrale à déléter (car non indispensable au cycle du phage). Les deux bras (gauche et droit) sont séparés de la partie centrale par ultracentrifugation). Cette technique est maintenant rarement utilisée.

Préparation du DNA à introduire et construction de l'hybride

Que l'on utilise la stratégie de l'insertion ou celle de la délétion – remplacement, le DNA à introduire doit être coupé par un enzyme de restriction donnant des bouts cohésifs, identique à ceux des bras du phage.

Le DNA à introduire doit aussi posséder une taille que le phage peut accepter soit :

- 1 à 12 kb pour la stratégie de l'insertion simple

- 8 à 12 kb pour la stratégie de la délétion - remplacement.

Afin de satisfaire à cette condition de longueur, le DNA à introduire est partiellement digéré par une enzyme de restriction, dans des conditions donnant des grands fragments. Après digestion, les fragments de taille adéquate sont purifiés par ultracentrifugation. Les recombinants sont alors obtenus en incubant le DNA ainsi préparé avec le bras de phages phosphatasés, en présence de ligase.

Le résultat est un long concatémère de recombinants, ce qui est la forme nécessaire à l'encapsidation *in vitro* (packaging).

L'encapsidation *in vitro*

Le DNA phagique nu n'est infectieux pour la bactérie que s'il est **empaqueté** dans la tête d'un phage. À partir du DNA phagique concaténé et d'extrait protéique, il est possible de reformer un virus infectieux, capable de se propager chez la bactérie comme un phage naturel. Cette expérience porte le nom **d'encapsidation *in vitro***. L'ensemble des protéines nécessaires à la constitution du phage sont extraites de 2 souches d' *E. coli* lysogène pour le phage λ (souche BHB 2688, souche BHB 2690). Cela, en incubant les deux souches en 42 C (température permettant le passage en phase de lyse), ce qui provoque la synthèse des protéines phagiques, ces protéines sont extraites et mélangées au DNA phagique recombinant en présence de l'ATP. Les phages vont s'assembler et le DNA recombinant sera empaqueté dans les têtes (il existe sur le marché des systèmes d'empaquetage tout prêts).

Des bactéries seront infectées et étalées, en gélose molle, sur boîte d'agar. Chaque plaque de lyse correspond à un phage recombinant.

3.3. Les différents phages utilisés en biologie moléculaire

3.3.1. Les phages de première génération : Le phage λ

Le phage λ est le phage le plus utilisé, des modifications comme la suppression de certains sites de restriction l'ont rendu utilisables pour les expériences de la biologie moléculaire. La plupart des phages à DNA double brin utilisés au laboratoire dérivent de ce phage. Il est constitué de 48502 paires de bases, dont la séquence est entièrement connue. L'hôte qu'il infecte est *E. coli*.

Le DNA, qui localisé dans la tête, est linéaire, les extrémités appelées **cos** sont constituées par DNA sous forme simple brin sur une longueur de 12 bases. Ces extrémités cohésives permettent au phage de se concaténer et de se circulariser, une telle circularisation étant observée dans la bactérie, immédiatement après infection. Le phage λ peut aussi bien être utilisé avec la stratégie de l'insertion simple qu'avec celle de la délétion-remplacement.



Figure : Extrémités cohésives du phage lambda (cos)

Les phages de deuxième génération :

Les phages EMBL 3 et 4 : ces deux phages sont très proches du phage λ classique. La différence majeure, qui fait tout l'intérêt de ces phages, consiste en l'addition d'un polylinker aux deux extrémités de la zone de DNA qui sera déléetée pour laisser place au DNA à cloner. EMBL 3 et 4 ne diffèrent que par l'orientation de ce polylinker. Ces phages ne peuvent être utilisés qu'en délétion – remplacement. Il est possible d'introduire des fragments de 15 à 20 kb. Ce sont donc les phages de choix pour la constitution des banques génomiques

Les phages λ GEM 11 et 12 :

Ces phages sont destinés à la réalisation de banques génomiques et correspondent à des versions améliorées des phages EMBL 3 et 4. La taille des fragments qu'il est possible d'insérer est comprise entre 9 et 23 kb. Deux types d'amélioration ont été apportés :

Modification de polylinker : le polylinker de λ GEM 11 et 12 comporte un plus grand nombre de sites de coupures uniques pour des enzymes de restriction, ce qui apporte une plus grande souplesse dans la constitution des recombinant.

Apport de promoteur des RNA polymérase spécifiques : un promoteur pour T7 RNA polymérase a été introduit à l'extrémité du bras gauche avant le polylinker, symétriquement un promoteur pour T3 RNA polymérase a été introduit à l'extrémité du bras droit. Ces promoteurs permettent de synthétiser des ribosondes correspondant spécifiquement à chacune des extrémités du DNA cloné.

Le phage λ gt 11 : ce phage dérive aussi du phage λ . Il ne peut être utilisé que par la stratégie de l'insertion et sert principalement au clonage des cDNA dont la longueur peut atteindre 6 à 8 kb

Le phage λ ZAPII**Le phage monobrin M13****Les autres types de vecteurs****Les cosmides**

Les cosmides sont des **vecteurs artificiels** constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutées les séquences **cos du phage λ** , séquences permettant l'empaquetage d'un recombinant d'une cinquantaine de kilo bases dans la tête des phages λ . L'intérêt des cosmides est de permettre le clonage de fragments très longs : environ 45 kb

La technique d'utilisation est hybride entre celle des plasmides et celle des phages. Le cosmide est ouvert par une enzyme de restriction et les extrémités sont phosphatasées, les fragments de DNA à

insérer doivent être sélectionnés de telle sorte que leur taille soit comprise entre 35 et 45 kb. Après ligation, le DNA recombinant est empaqueté dans des têtes des phages exactement comme s'il s'agissait de phages. Les bactéries sont infectées avec ce pseudophage, ce qui permet d'obtenir des rendements d'intégration infiniment supérieurs à ceux que donne une transformation bactérienne par un plasmide. Une fois dans la bactérie ce pseudophage se comporte comme un plasmide. Contrairement aux phages, il ne détruit pas la bactérie infectée. Des colonies bactériennes sont donc obtenues et non pas des plages de lyse comme cela aurait été le cas avec un vrai phage.

Les vecteurs navette

Les vecteurs navette sont des vecteurs artificiels destinés à être utilisés aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Ils permettent de passer de manière simple de l'un à l'autre. Leur construction comprend au minimum :

- un gène permettant la sélection des recombinants chez les bactéries : par exemple, un gène de résistance aux antibiotiques
- Un gène permettant la sélection chez les eucaryotes
- un promoteur eucaryote fort avec éventuellement un enhancer et une origine de réplication
- les séquences toxiques pour les bactéries ou les cellules eucaryotes doivent être excisées pour assurer la double compatibilité.

Ces vecteurs sont utilisés pour introduire une séquence chez les eucaryotes par transfection, séquence qui pourra être récupérée ultérieurement par clonage dans une bactérie afin d'étudier par exemple les modifications qu'elle a pu subir.

Remarque

Il existe d'autres types de vecteurs, comme les vecteurs eucaryotes, les vecteurs viraux, ainsi que les chromosomes artificiels à l'instar des chromosomes artificiels de levure YAC (Yeasts Artificial Chromosomes) et les chromosomes artificiels de bactérie BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

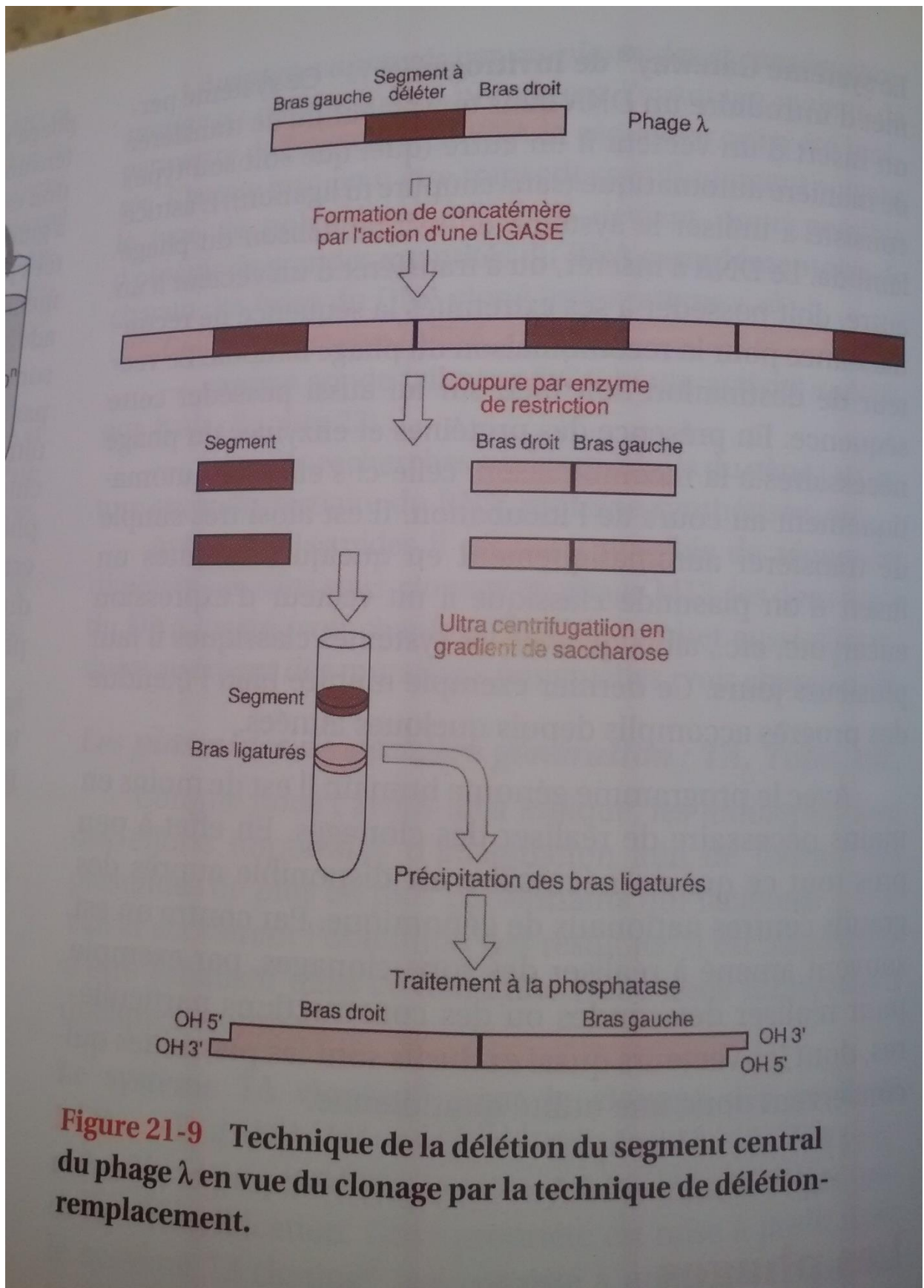


Figure 21-9 Technique de la délétion du segment central du phage λ en vue du clonage par la technique de délétion-remplacement.

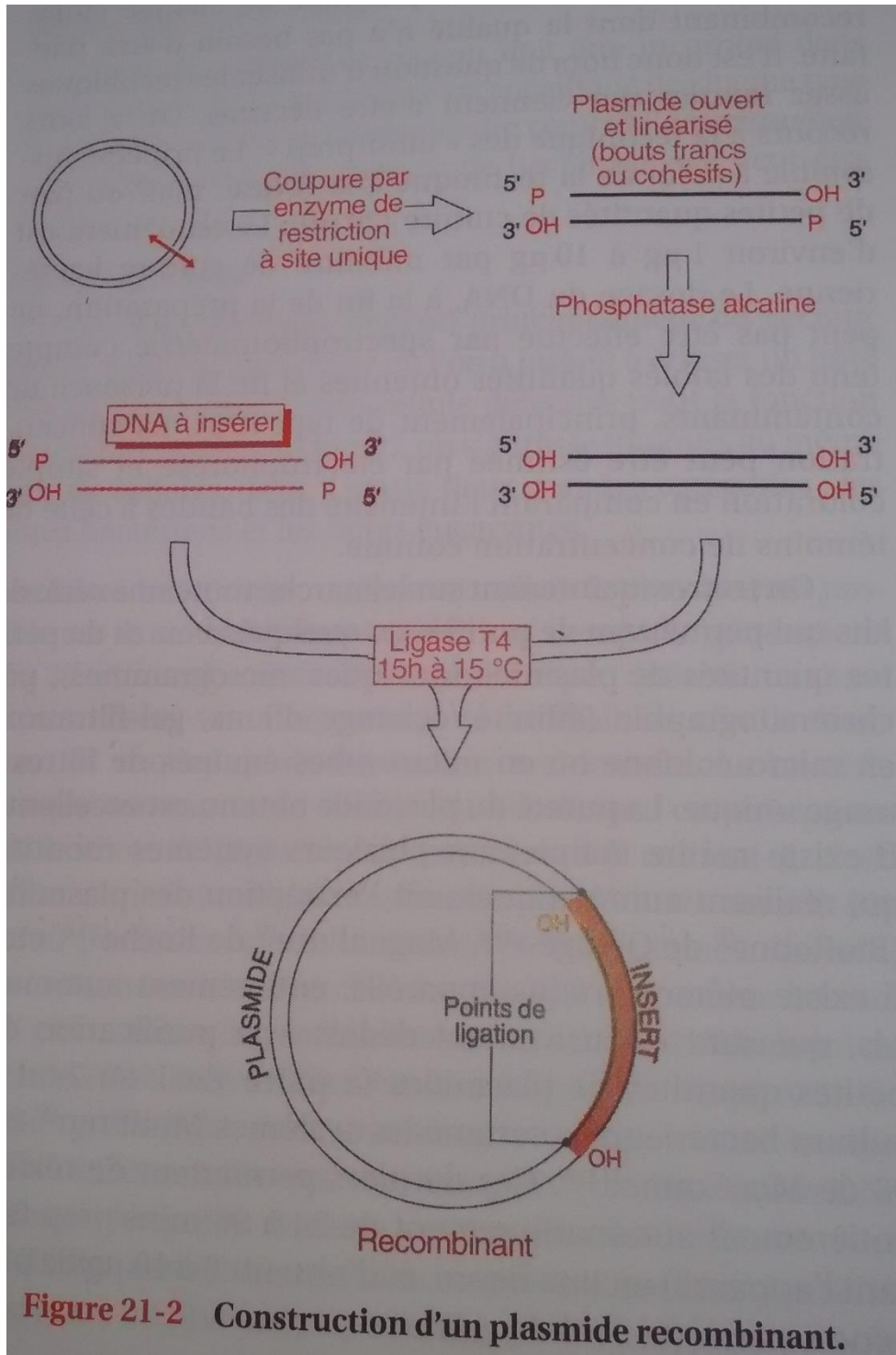


Figure 21-2 Construction d'un plasmide recombinant.

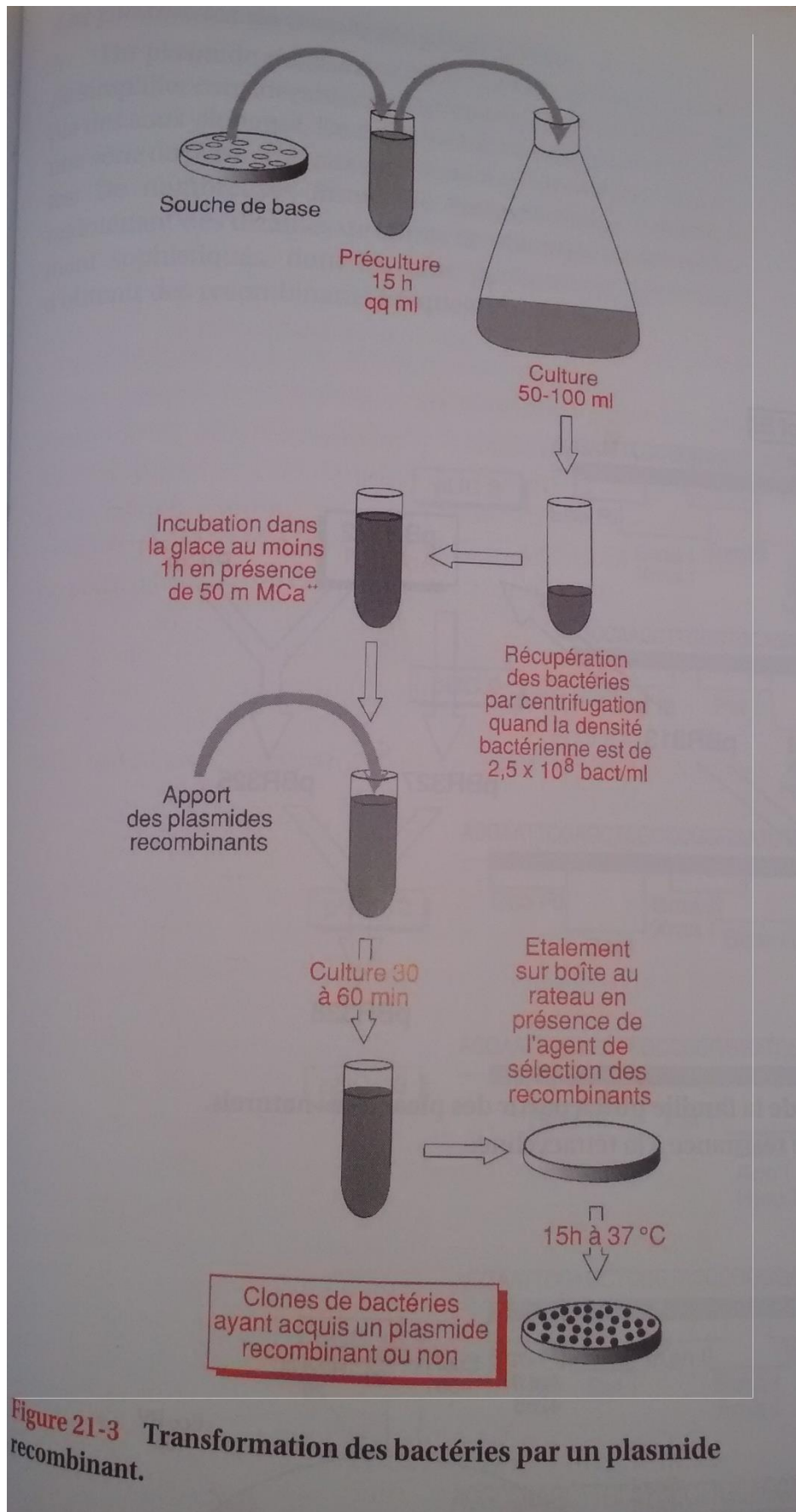


Figure 21-3 Transformation des bactéries par un plasmide recombinant.

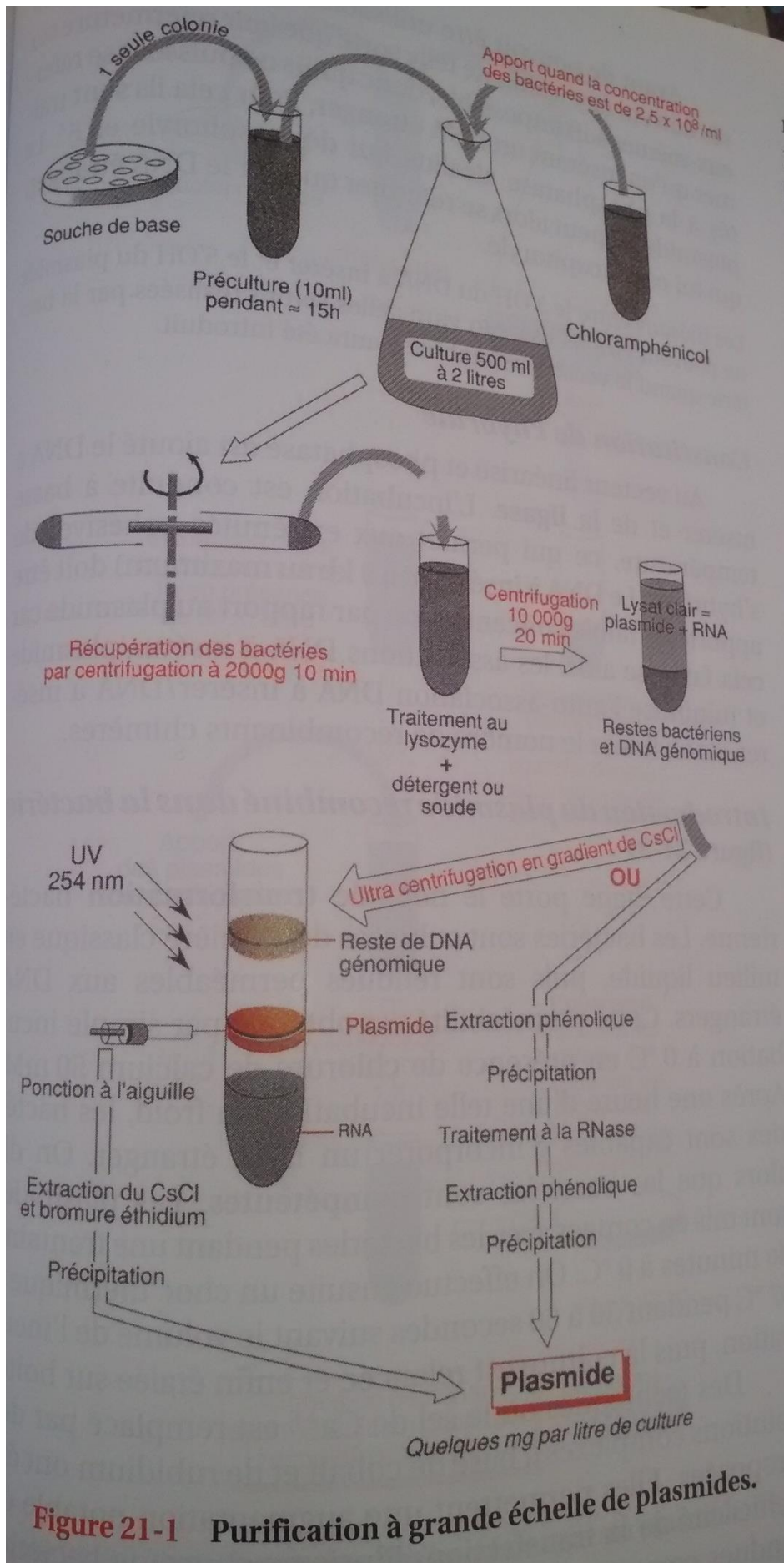


Figure 21-1 Purification à grande échelle de plasmides.

