



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF  
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

# **COURS 6:**

# **HOTES DE CLONAGE**

Dr ABDI Meriem  
Génie génétique, Licence 3 Biochimie

# HOTES DE CLONAGE

- En biotechnologie, le génie génétique est utilisé à des fins commerciales comme pour la production de nouveaux vaccins, de grandes quantités de protéines valorisables, ou l'introduction de gènes spécifiques dans un organisme animal ou végétale.
- Dans chaque cas, le choix de l'hôte est essentiel puisqu'il nous oriente vers un type de vecteur adapté.

# HOTES DE CLONAGE

- Pour se répliquer, un vecteur doit être incorporé dans une cellule hôte spécifique de chaque type de vecteur.

**Exemple :** si le vecteur est un plasmide, la cellule hôte est une bactérie. La cellule hôte ne doit pas modifier ou détruire l'ADN recombiné.

# HOTES DE CLONAGE

l'hôte idéal doit:

1. Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
2. Non pathogène.
3. Capable d'incorporer l'ADN.
4. Stable en culture.
5. Possède des enzymes appropriées pour la réplication du vecteur.

# HOTES DE CLONAGE

Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés et génétiquement manipulables.

# HOTES DE CLONAGE

On distingue 2 catégories d'hôtes :

## **1. Les hôtes bactériens:**

Ce sont les hôtes les plus utilisés car ils se multiplient rapidement et sont faciles à manipuler.

Les bactéries utilisées ne sont pas pathogènes et sont modifiées afin de diminuer les risques de dissémination accidentelle.

# HOTES DE CLONAGE

La bactérie de choix est E. coli qui doit être :

- une souche « res- » : ne produit pas des enzymes de restriction pour ne pas détruire l'ADN étranger inséré.
- « recA- » : pour éviter la recombinaison de l'ADN bactérien avec l'ADN inséré
- Réceptrice donc « F- » : incapables de transmettre le plasmide qu'elles ont reçu ; par opposition aux souches donatrices F+
- Certaines expériences nécessitent des souches « lac- ».

# HOTES DE CLONAGE

## Les hôtes eucaryotes:

Peuvent être des cellules animales en culture, des levures ou des plantes.

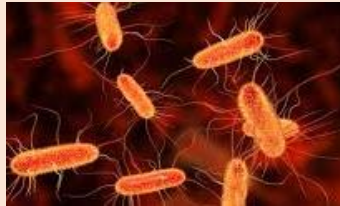
Leur manipulation est complexe et coûteuse. Ils ne sont utilisés que :

- Utilisation des vecteurs ayant une origine de réplication eucaryote
- Etude de la régulation in vivo d'un gène eucaryote
- Expression d'une protéine qui ne peut être fonctionnelle qu'à la suite de certaines modifications post-traductionnelles (telle que la glycosylation) que la bactérie ne peut pas réaliser.



# EXEMPLES D'HOTES DE CLONAGE

## Escherichia coli



Procaryotes

- Génétiquement très bien connue
- Nombreuses souches disponibles
  - Procaryote le plus connu

- Potentiellement pathogènes
- Périplasma piégeant les protéines

## Bacillus subtilis



Procaryotes

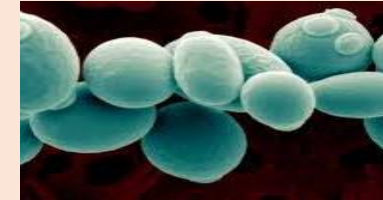
### Avantages

- Facilement transformable
- Non pathogène
- Protéines secrétés naturellement
- Formation d'endospores facilitant les cultures.

### Inconvénients

- Génétiquement instable
- Génétique moins connue qu'E-coli

## Saccharomyces cerevisiae



Eucaryotes

- Génétiquement très bien connue
  - Non pathogènes
- Assure la maturation des ARNm et des protéines
  - Facile à cultiver.

- Plasmides instables
- Pas de réplication pour la plupart des plasmides procaryotes

Le processus d'intégration de l'ADN étranger est appelé:

**Transformation** dans les cas des bactéries

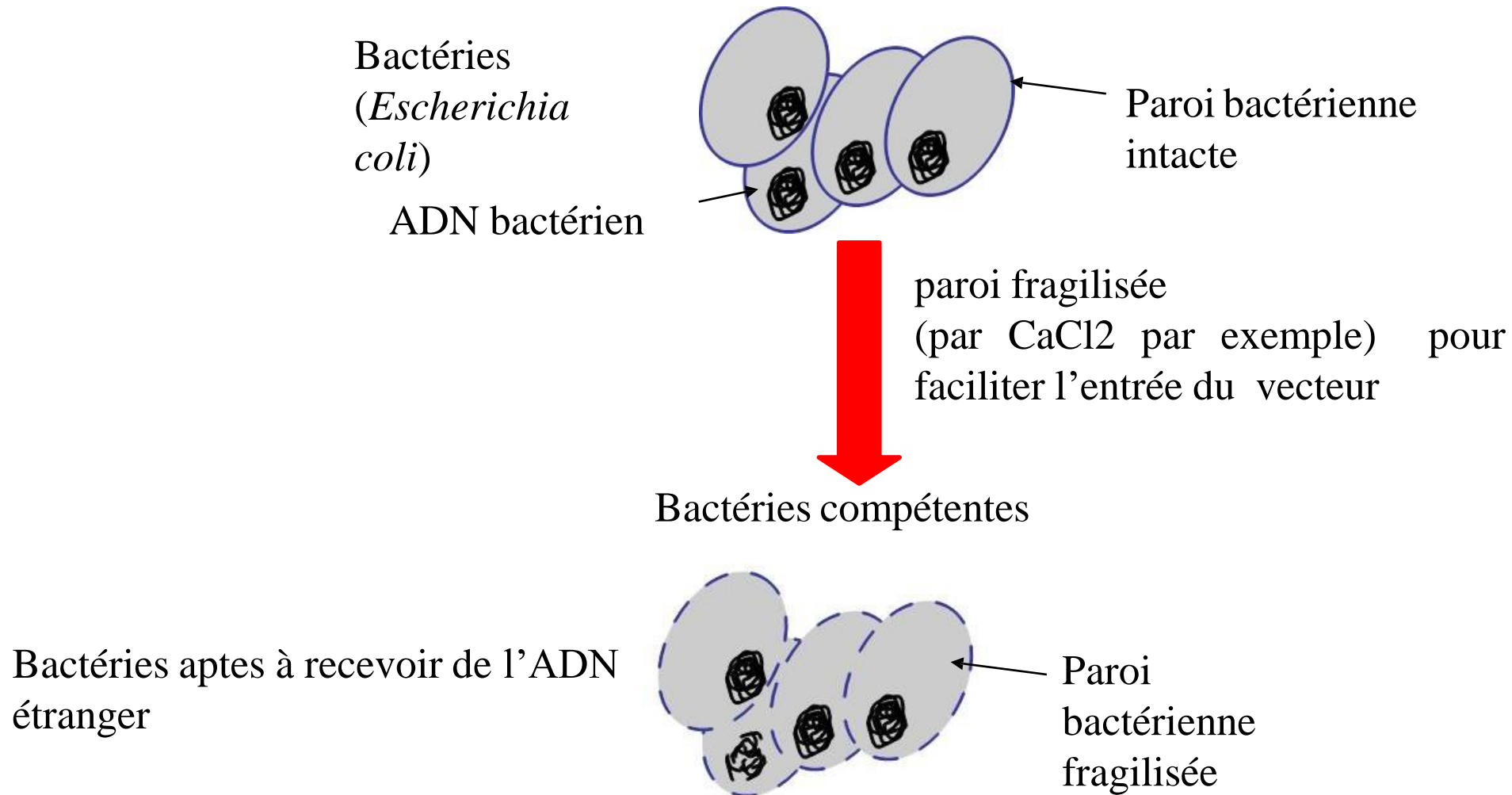
**Transfection** pour les eucaryotes

# TRANSFORMATION BACTERIENNE

- Consiste à faire entrer le plasmide recombinant porteur du gène d'intérêt dans une cellule hôte où il pourra se répliquer en grande quantité
- Ce n'est **pas un phénomène naturel** donc :
- Rendre les bactéries compétentes → fragiliser la paroi bactérienne pour faciliter l'entrée du plasmide
- Utilisation des **méthodes physico-chimiques** : choc thermique (de 0 à 42°C) ou choc électrique (électroporation) pour faire entrer l'ADN plasmidique.

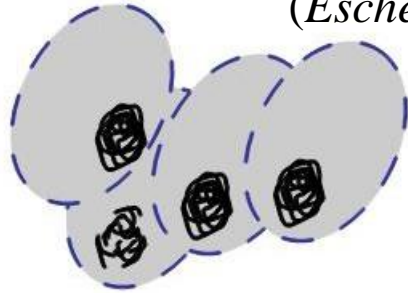
# LA TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

## 1. Méthodes physico-chimiques

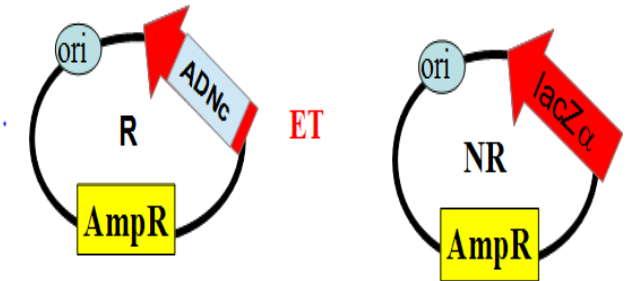


# SÉLECTION DES BACTÉRIES TRANSFORMÉES

Bactéries compétentes  
(*Escherichia coli*)

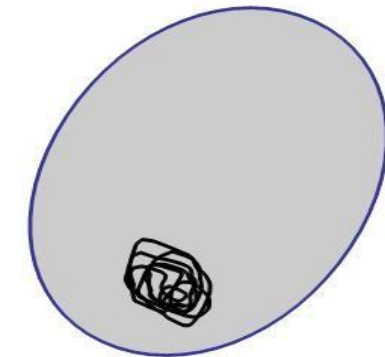
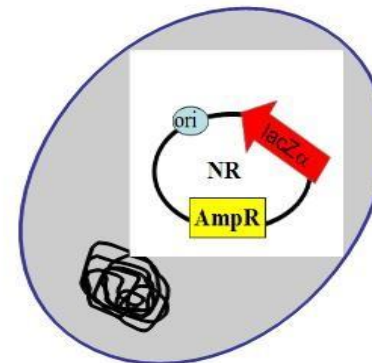
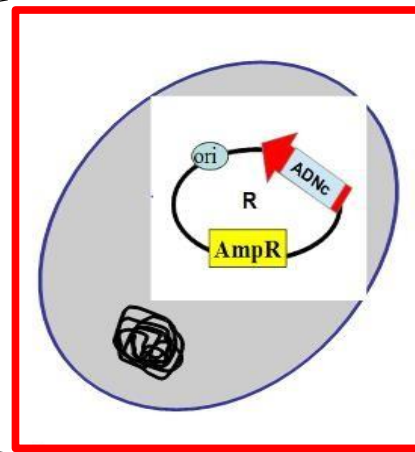


Résultat de la ligation  
ADN/vecteur



Efficacité de ligation d'un ADN sur un vecteur n'est jamais de 100%

**Bactéries transformées recombinantes à sélectionner**



Bactéries transformées

Bactéries non transformées

Efficacité de la transformation n'est jamais de 100%

# SÉLECTION DES BACTÉRIES TRANSFORMÉES

- L'efficacité de la ligature ADN/plasmide n'étant pas de 100 %
- L'efficacité de transformation de vecteur recombinant n'est pas de 100 %
- Des bactéries ne seront pas transformées et parmi les bactéries transformées on aura des bactéries transformées par un vecteur non recombinant et d'autres par un vecteur recombinant.

# SÉLECTION DES BACTÉRIES TRANSFORMÉES

- Il est fondamental de disposer de système de sélection double capable de discriminer à la fois :

-Les **bactéries transformées** des **bactéries non transformées**

-les **bactéries transformées par un vecteur recombinant** ou **non recombinant**

Deux méthodes de sélection des bactéries : Résistances au antibiotiques ou le Lac Z.

# METHODE DE SELECTION 1

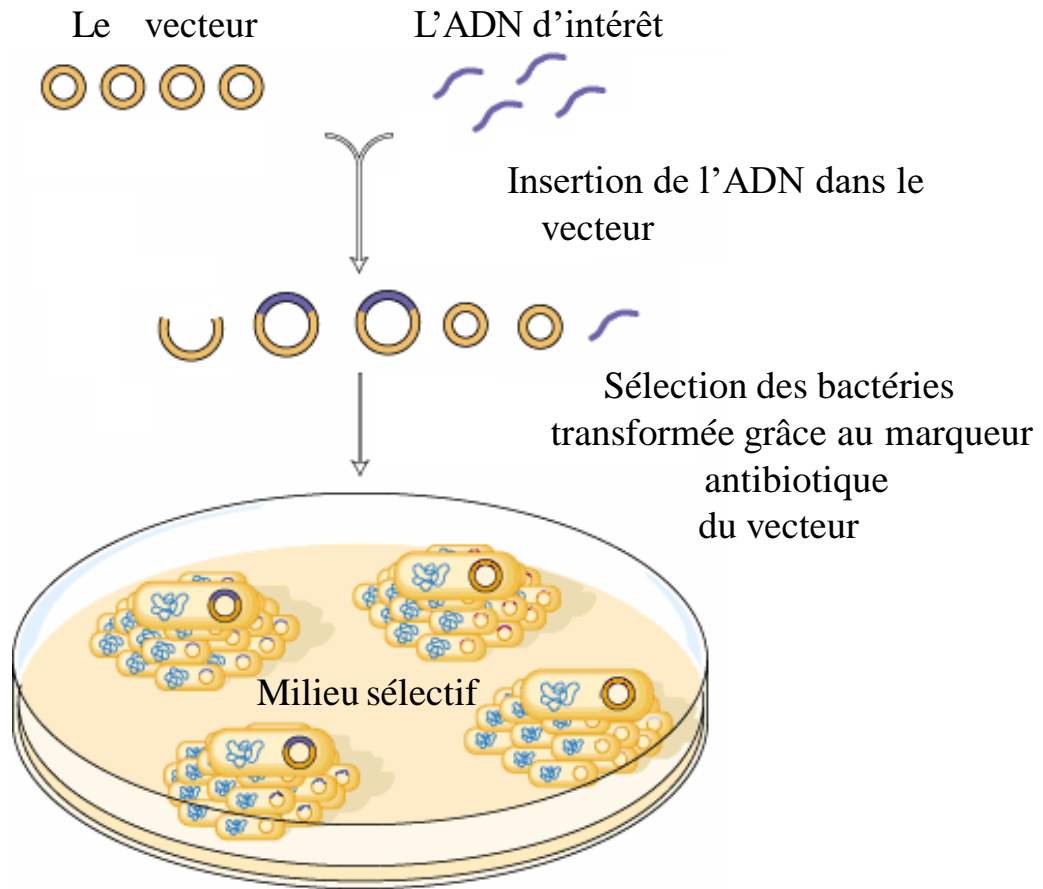
- La transformation d'une bactérie sensible à un antibiotique par des plasmides portant un gène de résistance au même antibiotique aboutit à l'apparition d'une résistance uniquement pour les bactéries ayant incorporé les plasmides.
- Cette première étape permet de séparer les bactéries avec plasmides et les bactéries sans plasmides
- Les bactéries sans plasmide sont tuées.



# METHODE DE SELECTION 1

- La deuxième étape consiste à distinguer les bactéries avec plasmides intacts des bactéries avec plasmides recombinants.
- On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique.
- L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide doit inactiver le gène de résistance au deuxième antibiotique.
- Les bactéries transformées par les plasmides recombinants sont donc résistantes au premier antibiotique et sensibles au deuxième antibiotique. Les bactéries transformées par les plasmides recombinants meurt.

# METHODE DE SELECTION 1



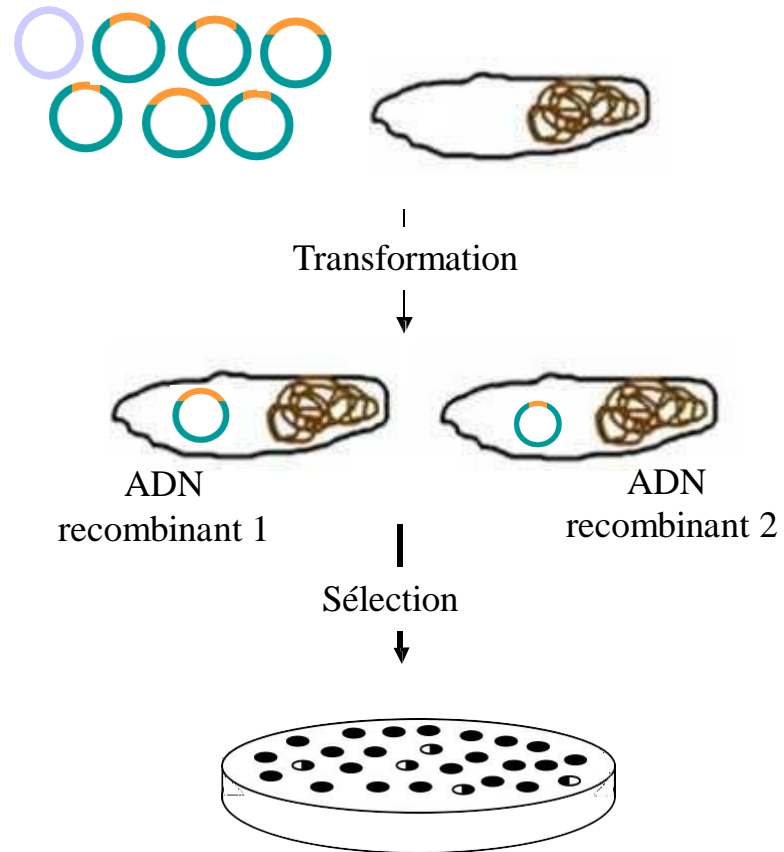
## METHODE DE SELECTION 2

- La première étape est identique à la méthode de sélection 1.
- La deuxième étape consiste à utiliser un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose à la place du second antibiotique.
- L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la b-galactosidase.
- Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique b-galactosidase, on utilise un galactoside X-gal dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la b-galactosidase.

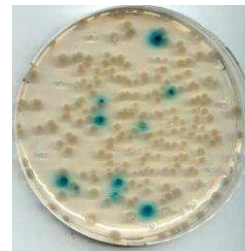
## METHODE DE SELECTION 2

- Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur le IPTG.
- En présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres.
- Par contre, les bactéries non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues.
- La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible.

# METHODE DE SELECTION 2



Les bleues ne contiennent que le plasmide « vide »



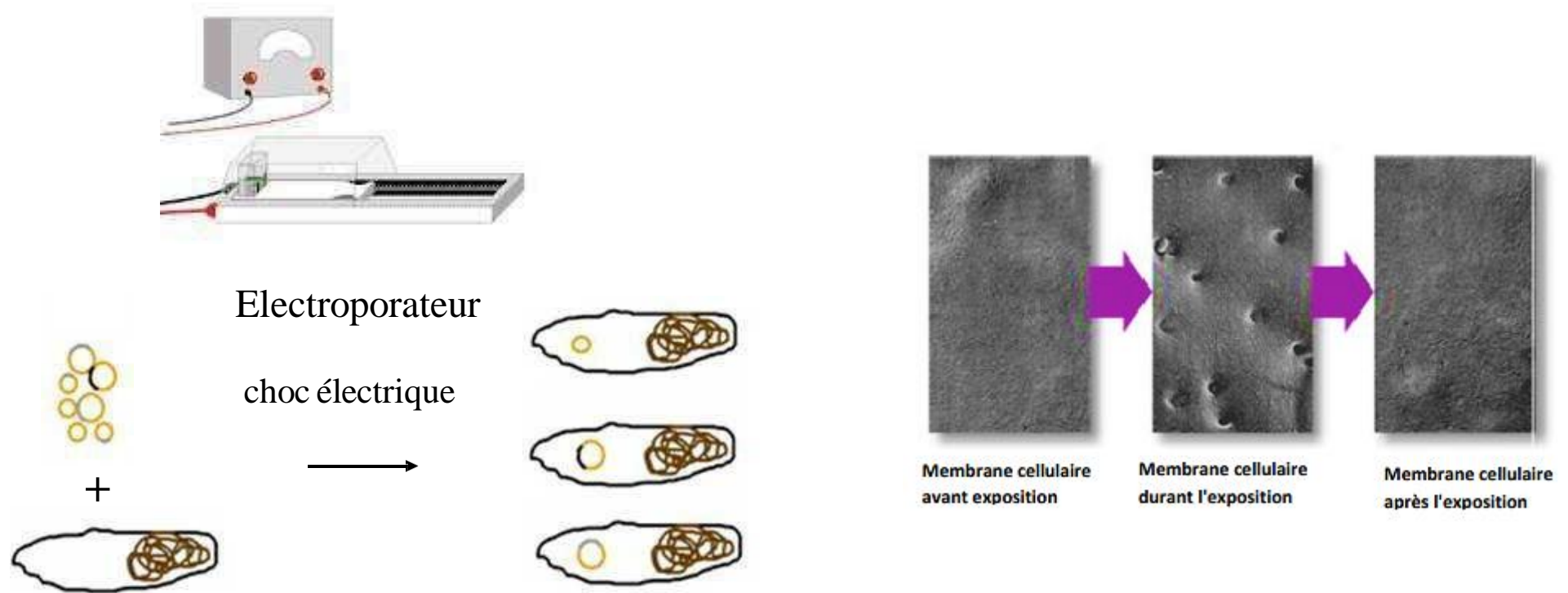
Antibiotique + X-gal

# **MÉTHODES D'INTRODUCTION DE L'ADN DANS LA CELLULE HÔTE**

Il existe plusieurs méthodes d'introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

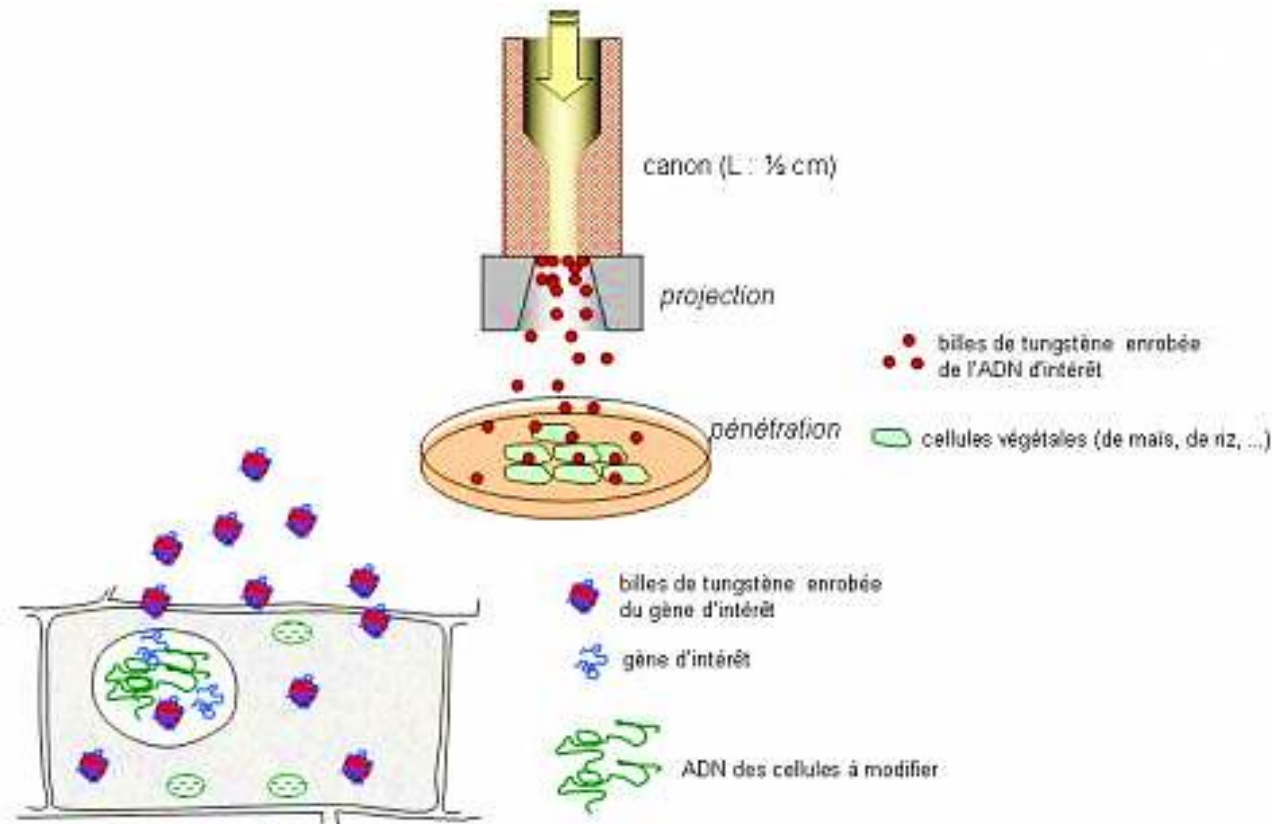
# ELECTROPORATION:

L'ADN est introduit par choc électrique



## UN CANON À PARTICULES:

La transfection des cellules cibles se fait par des billes métalliques recouvertes d'acides nucléiques, en perçant parois et membranes plasmiques sans provoquer de lyse cellulaire.

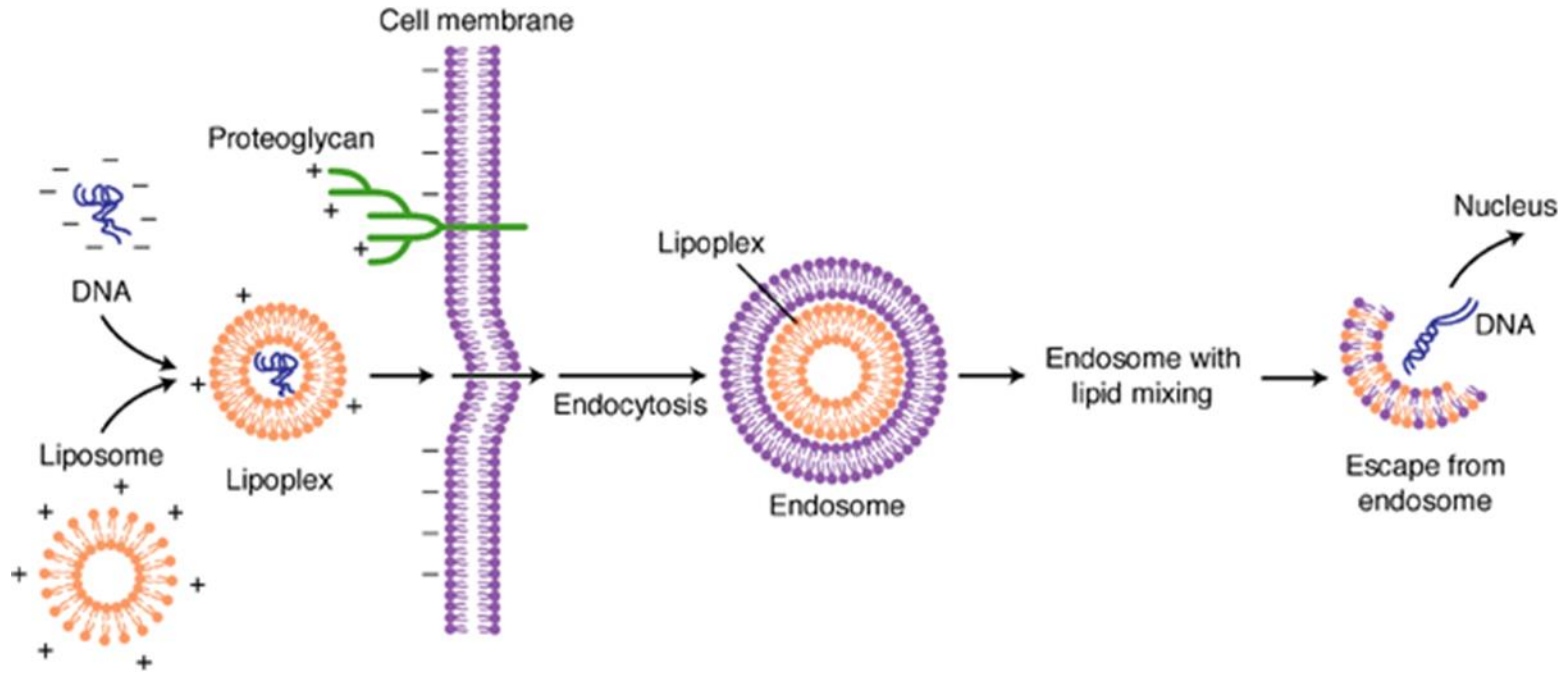




# LYPOSOMES:

L'ADN est introduit dans une vésicule lipidique appelée liposome

Fusion de la vésicule avec l'endosome et libération de l'ADN



## MICROINJECTION:

Dans les cellules animales, l'ADN peut être injecté dans le noyau par micro-injection

