

## Les vecteurs

### Définition:

- Un vecteur est un transporteur d'un ADN étranger, c'est une molécule d'ADN qui peut intégrer un ADN étranger pour permettre son transfert dans une cellule hôte, il permet de conserver une séquence d'ADN donnée, de la multiplier pour en accroître la quantité et de la réintroduire dans des cellules.

### Caractéristiques du vecteur :

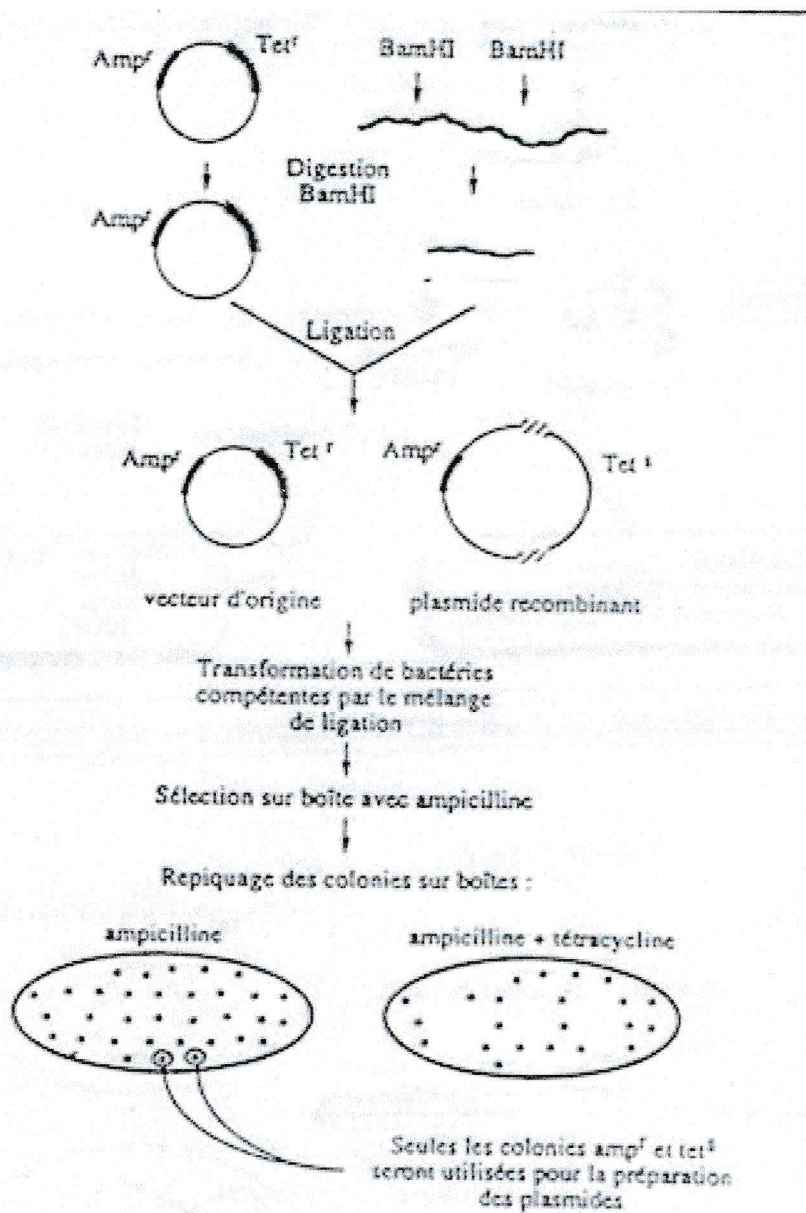
Il doit avoir

- Une origine de réplication (autonome)
- Un ou plusieurs sites de restriction uniques permettant d'introduire l'ADN
- Il doit supporter l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand
- Présence de marqueur indicateurs de la présence du vecteur dans la cellule
- Présence de marqueur indicateurs de la présence de l'insert dans le vecteur dans la cellule.

### Les plasmides :

Sont des molécules d'ADN circulaires naturellement présents dans les bactéries en plus des chromosomes bactérien. Ils ne contiennent généralement pas de gènes indispensables à la survie de la cellule. Ils apportent des gènes pouvant présenter un avantage dans des conditions de cultures particulières (antibiotique, métaux lourds, hyper salinité,) où ils vont apporter un avantage pour la croissance de la cellule.

- **Les PBR** : port le non des chercheurs qui les ont découvert, Plasmide de Bolivar et Rodriguez, ils ont été numérotés de 312 à 328, les plus utilisés jusqu'à maintenant c'est les PBR 322, leur taille est de 4363 Pb complètement séquencé et on est sûr qu'ils possèdent deux gènes de résistance aux antibiotiques la TET et l'AMP, on dénombre 20 sites uniques dont 11 se trouvent aux niveaux des gènes de résistance, les PBR constituent la première génération utilisée dans le clonage



La plasmide PBR 322 possède **un seul site de restriction** pour une enzyme (BamHI) qui est **situé au milieu d'un gène de résistance** à la tétracycline. On peut donc utiliser cette

enzyme de restriction pour insérer le gène de d'intérêt (fragment d'ADN à insérer) qui aura été isolé à l'aide de la même enzyme de restriction. L'utilisation de la même enzyme de restriction permettant d'assurer la présence d'extrémités **cohésives** qui permettent, dans le meilleur des cas la formation de plasmides recombinés, ayant intégré le gène d'intérêt au milieu de leur gène de résistance à la tétracycline.

La position du site de restriction au sein d'un gène de résistance à un antibiotique permet de réaliser facilement le criblage des transformants, c'est-à-dire le tri des plasmides ayant intégré le gène (plasmides recombinés). En fait ce criblage ne se fait pas sur les plasmides mais sur les souches d'*Escherichia coli* ayant intégré un plasmide. Il y a donc une étape supplémentaire d'insertion du vecteur (transformé ou non) dans des cellules vivantes bactériennes qui constituent l'organisme multiplicateur (phase de multiplication), ces souches doivent être obligatoirement sensible à l'ampicilline et à la tétracycline.

Après ensemencement sur une boîte contenant l'ampicilline (la boîte mère), on obtient toutes les souches contenant un plasmide (recombiné et natif) On réalise **une réplique** (technique des empreintes sur velours) sur un milieu contenant la pénicilline et la tétracycline et les souches qui ne se développent pas sont les souches qui ont intégré le gène (**bactéries recombinantes**). On peut donc les repérer par comparaison sur le milieu de culture sur la boîte mère et les cultiver séparément. On a donc une souche d'*Escherichia coli* qui a intégré, dans son cytoplasme, un plasmide pBR322 recombiné.

- **Les PUC :**

ce sont des Plasmide artificiels découverts à l'Université de Californie aux USA, leurs tailles est de 2600 pb, il contient une origine de répllication, un marqueur de sélection( AMP) provenant du PBR 322, et un polylinker: une séquence d'ADN regroupant tous les sites de restriction uniques, au niveau du polylinker on ajoute une autre séquence d'un gène Lac Z, ce gène produit la  $\beta$ -galactosidase,

Le **X-gal** composé incolore peut être hydrolysé par la  $\beta$ -galactosidase, ce qui donne une coloration bleu.

Les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres suite à la perte de la capacité de clivage ou de dégradation de l'équivalent du lactose (X-gal).

Par contre, les bactéries résistantes à l'ampicilline et non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues.

La sélection est donc visuelle et facile dès la première boîte

