1. **Recombinaison génétique**

La recombinaison génétique permet de rassembler dans une même souche deux caractères situés dans des souches différentes.

 La nouvelle combinaison peut présenter un avantage économique ou technique .

En tout état de cause , la recombinaison génétique est créatrice d’une nouvelle possibilité et permet d’obtenir un type biologique nouveau.

**1. Recombinaison d'ADN**

Des séquences d'ADN en cellules sont mises à jour ainsi de génération en génération avec très peu de modification. Tandis Que c'est vrai, évidemment la Séquence d'ADN en chromosomes change avec du temps et l'ADN obtient permuté au fil du temps.

La combinaison des gènes sur le génome peut changer en raison de tels réarrangements d'ADN. Dans une population, ce tri de variation génétique est important pour permettre à des organismes d'évoluer en réponse à un environnement en cours d'évolution. Ces réarrangements d'ADN sont provoqués par une classe de recombinaison génétique appelée de mécanismes.

**1.1.Recombinaison Homologue d'ADN**

La forme la plus importante de la recombinaison génétique est recombinaison homologue. Le procédé concerne les faits de base tels que deux doubles Molécules d'ADN bicaténaires qui ont des régions de Séquence d'ADN (homologue) très assimilée viennent ensemble de sorte que leurs séquences homologues soient en tandem.

1. **Recombinaison de Non-homologue ADN**

Dans la recombinaison homologue, les réarrangements d'ADN se produisent entre les Segments d'ADN qui sont très assimilés dans l'ordre. Une seconde, un type plus spécialisé de la recombinaison, recombinaison site-particulière appelée, permet à des échanges d'ADN de se produire entre les doubles hélix d'ADN qui sont différents dans la séquence de nucléotides.

1. **Recombinaison génétique chez la levure**

La levure peut avoir de nombreux types de cycle biologique. Certaines espèces sont toujours homothalliques ou hétérothalique dans la nature . Mais les études génétiques montrent que le passage de l’homothallisme à **l’hétérothallisme** est sous le contrôle d’un petit nombres de gènes..

D’autre présentent des copulations somatogames: la copulation a lieu alors entre la cellule mère et son bourgeon en cours d’émission.

Dans ces 2 cas , il n’est naturellement pas possible d’obtenir de recombinaison génétique.

Le but recherché est en général la recombinaison de 2 caractères présents dans 2 souches haploïdes de signe opposé. Les techniques utilisées sont les suivantes

1. **Hybridation**
2. **1. Hybridation Moléculaire**

Association de 2 simples brins d'ADN (ADNs) par formation de liaisons H entre ces deux brins.

On distingues les hybrides:

• ADN-ADN = Homoduplex

• ADN-ARN = Hétéroduplex

* 1. **Hybridation spontanée**

On parle indifféremment d’hybridation spontanée ou naturelle. En réalité, il serait préférable de réserver l’expression « hybridation naturelle » aux croisement qui se produisent dans la nature , sans aucune intervention de l’homme , autre que l’introduction involontaire de son fait de plante adventices ou naturalisées , dans les jardins botaniques , il se produit souvent des hybridations qui sont bien spontanées, puisque se produisant sans aucune manipulation d’un expérimentateur, mais qui ne sont pas naturelles, puisque s’effectuant entre des espèces d’origine géographique différente, volontairement rapprochées dans ces jardins , mais dont la rencontre n’a aucune chance de se produire dans la nature .

1. **Hybridation para-sexuelle**

Elle a été observée chez un certain nombre de Champignons filamenteux, où la fréquence des anastomoses favorise l’établissement d’un thalle *hétérocaryotique* et la fusion éventuelle de deux noyaux d’origine différente. Elle assure la recombinaison (hybridation) des caractères héréditaires non par le jeu normal de la reproduction sexuelle, mais au cours des mitoses du cycle végétatif, que subit un noyau porteur de potentialités génétiques hétérogènes

**N.B. Le crossing–over peut avoir lieu durant la mitose bien qu’en très faible fréquence comparée à la méiose. Ceci aboutit à l création de chromosomes qui sont hybrides des chromosomes parentaux .**

**B. Hybridation sexuelle**

La variation sexuée est le mécanisme majeur produisant des recombinants génétique qui en résulte , cependant dépend du degré avec lequel l’inbreeding ou l’outbreeding a lieu.

L’inbreeding implique la reproduction sexuée entre individus qui sont plus étroitement liés que ceux d’un échantillons pris au hasard dans la population qui existe naturellement, tandis que l’outbreeding a lieu entre des individus qui sont moins étroitement liés.

L’intbreeting tend à crée une population homogène tandis que l’outbreeding entraine une plus grand hétérogènéité génétique, fournissant la variabilité nécessaire pour l’évolution.

 Linbreeding caractérise l’homothallisme tandis que l’outbreeting caractérise l’hétérothallisme chez les champignons.

1. **Clonage**
* Le clonage permet l’insertion d’un fragment d’ADN dans un vecteur permettant ainsi d’en obtenir plusieurs copies.
* Le clonage est le processus par lequel des cellules identiques sont formées à partir d’une simple cellule ou d’un tissu.
* Le clonage est donc une forme de reproduction asexuée**.**

**3.1.Vecteurs de clonage**

**a. Plasmides**

Molécules d'ADN bicaténaire circulaire, extrachromosomique, capables de se répliquer indépendamment de la cellule hôte, transmissibles à la descendance de façon stable.

Ils sont facultatifs : ne portent pas d'informations génétiques nécessaires à la bactérie mais peuvent apporter des avantages sélectifs (résistance aux ATBs).

Les activités biologiques apportées par les plasmides naturels concernent 3 domaines principaux : la résistance aux ATBs et métaux lourds, le pouvoir pathogène, le métabolisme taille des plasmides naturels varie entre 1 et 400 kpb selon le plasmide, le nombre de copies de plasmide par bactérie varie (1 à 20).

En pratique, les plasmides utilisés en laboratoire comme vecteur de clonage sont tous des plasmides artificiels créés à partir de plasmides naturels auxquels certaines séquences ont été ajoutées (marqueurs de sélection, par exemple).

**b.Bactériophages**

Phage de E. coli - ADN monocaténaire circulaire de 6400 nucléotides. Se fixe sur les pili des bactéries mâles.

Cycle non lytique : ne tue pas les bactéries infectées mais retarde leur croissance

**c.Phagemide et cosmide**

Combinaison plasmide-phage : réplication plasmidique et encapsidation phagique (cosmide)

 - un vecteur hybride de synthèse, formé de l'origine de réplication d'un phage, de séquences d'un plasmide et d'un gène marqueur, servant à cloner des fragments de gène d'un organisme.(phagemide)

Avantage : permet d'insérer des fragments d'ADN plus grand (de 30 à 45 kpb pour les cosmides)



4. **Clonage des gènes et la biotechnologie fongique future**

Obtention des séquences d’ADN qui codent pour protéines des mammifères

* Disposer de l’ADN codant pour la protéine
* L’insérer dans un hôte : Hôte = usine à production de protéines
* Extraire la protéine

**Exp :**

* **Vaccins recombinants :**

Enveloppe protéique de la capside de virus de l’hépatite B. Protéine L1 du papillomavirus : Gardesi I® (HPV 6, 11, 16 , 18) Merck, Sanofi Pasteur, Cervarix ® GlaxoSmithKlein

* **Anticorps monoclonaux**

Premi monoclonal anti-VEGF ([Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire](https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwiczKfftKfTAhUDsBQKHcmNCaEQFgggMAA&url=https://fr.wikipedia.org/wiki/Facteur_de_croissance_de_l%E2%80%99endoth%C3%A9lium_vasculaire&usg=AFQjCNEOzBOYzUri4Ob1BY_v06TaBfZ04g&bvm=bv.152479541,d.ZWM)). Le Bevacizumab se lie au VEGF et prévient son action sur les récepteurs endothéliaux (VEGFR ) d’où une baisse de la vascularisation tumorale et un effet anticancéreux. Bevacizumab : AVASTIN® approuvé par FDA, comme permettant une survie prolongée de 30% pour les cancers colorectaux.

**4.1. Introduction d’ADN dans la cellule fongique**

**a. Transformation après traitement chimique:**

Chez certaines espèces, le traitement par des sels, permet de transformer des cellules entières (non protoplastisées) avec une efficacité. Même principe que le traitement chimique des *E.coli.*

Dans des conditions salines particulières et en présence d’un agent fusogène (polyéthylène glycol= PEG), l’ADN peut être introduit dans les protoplastes, suite à un choc thermique. Les cellules sont mises à régénérer , souvent dans un gel d’agarose qui évite une diffusion trop rapide dans le milieu des précurseurs de paroi. Très bonne efficacité si la régénération est bien contrôlée

**b.Electroporation**

Cette technique est plus universelle que celle de transformation induite par traitement chimique.

Les cellules, souvent après croissance dans des conditions qui fragilisent leurs parois, sont lavées et ré-suspendues dans milieu isotonique et de base de conductivité (souvent du saccharose, ou du glycérol). Elles sont placées avec l’ADN, dans une cuvette contenant des électrodes. l’ ADN entre par des « pores » formés dans la membrane fongique par une brève décharge électrique entre les électrodes (1000 à 10000 volts/cm)



**c.Conjugaison bactérie- levure**

Des vecteurs conjugatifs peuvent passer d’ *E.coli* à la levure (et s’y maintenir s’ils ont une origine de réplication et de marqueurs compatibles avec la levure). Quelque peu anecdotique chez la levure, et encore plus chez les cellules de mammifères, ce phénomène rappelle la conjugaison *Agrobacterium-*plante.

**d. Biolistique**

Des particules de tungstène ou d’or de diamètre de quelques microns et recouvertes d’ADN sont projetées à très haute vitesse par un « fusil » sur les cellules. Utilisé pour tous les organismes eucaryotes, la biolistique est la seul méthode connue pour amener de l’ADN dans les mitochondries des levures.

**4.2**. **Expression d’ADN hétérologue chez les mycètes (levures)**

De nombreuses lignées différentes de levures sont utilisées pour la production de protéines recombinantes *Hansenula polymorpha, Klyveromyces lactis, Pichia methanolica, Candida maltosa ou Yarrowia lipolytica ont été* utilisées pour la production de protéines solubles recombinantes, mais seulement trois levures ont été utilisées pour l’expression hétérologue de protéines membranaires. Il s’agit de *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe et Pichia pastoris. Saccharomyces cerevisiae est le système le plus étudié et le mieux connu génétiquement et* physiologiquement