

Génie génétique

Chapitre I

Enzymes de restriction et de modification de l'ADN

1- Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases spécifiques, leur utilisation permet d'obtenir des fragments d'ADN aux extrémités bien caractérisées, dont certains peuvent contenir des gènes.

Il existe trois types d'enzymes de restriction isolées des bactéries.

- 1- **Type I** : Dont l'action nécessite la présence de Mg^{++} , d'ATP comme cofacteur, et de S- adénosyle-méthionine. Leur site de coupure est éloigné de leur site de reconnaissance (jusqu'à plusieurs milliers de nucléotides, plus loin dans certain cas).
- 2- **Type II** : Pratiquement les seules utilisées en génie génétique, reconnaissent l'ADN à des sites particuliers et coupe coupes dans ces sites ou à proximité immédiate d'eux. Ce sont des nucléases qui coupent à l'intérieur, donc ce sont des endonucléases (Type II restriction endonucléases).
- 3- **Type III** : Ressemblent à celles du type I pour la séparation des sites de reconnaissance et de coupure, mais qui s'apparentent à celles du type II par leur mode d'action.

Tab.1: Nombre des sites de coupure de quelques enzymes de restriction de type II sur le génome des virus SV40, λ , et l'adénovirus 2.

Origine microbienne	Enzyme	Site de coupure	Nombre de sites de reconnaissance par génome		
			SV40	λ	Adénovirus 2
<i>E. coli</i> KY13	<i>EcoRI</i>	G [↓] AA*TTC	1	5	5
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>HindII</i>	*A [↓] AGCTT	6	6	11
<i>Haemophilus parainfluenza</i>	<i>HpaII</i>	C [↓] C*GG	1	>50	>50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	G [↓] GA*TCC	?	?	?
<i>Haemophilus aegypticus</i>	<i>HaeIII</i>	GG [↓] CC	18	>50	>50

* indique la méthylation.

1-1- Nomenclature des enzymes de restriction

Les trois premières lettres de chacune d'entre elle concernent

- La première lettre du nom de genre, par exemple E (*Escherichia*)
- Les deux premières lettres du nom de l'espèce, par exemple co (*coli*).
- La quatrième concerne la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme en question.
- Le chiffre romain: indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche. *HindIII* signifie que c'est la troisième (III) Enzyme de restriction isolée et caractérisée de la souche bactérienne *Haemophilus influenzae* Rd.

Tab. 2: Exemples des enzymes de restriction de type II.

Enzyme	L'organisme source	Séquence de reconnaissance
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC CTAG/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC CTAG/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

N: n'importe quelle base **R:** n'importe quelle purine **Y:** n'importe quelle pyrimidine **/:** Position de coupure.

La plupart des enzymes de restriction de type II ont un site de reconnaissance de 4 ou 6 paires de bases, et un certain nombre d'enzymes de restriction reconnaissent des séquences à 5 ou à 7, 8 ... paires de bases.

Les enzymes à site de reconnaissance tétra-nucléotidique ou hexa- nucléotidique présentent en générale un axe de symétrie rotatoire palindromique (fig. 1), au centre de leur séquence.

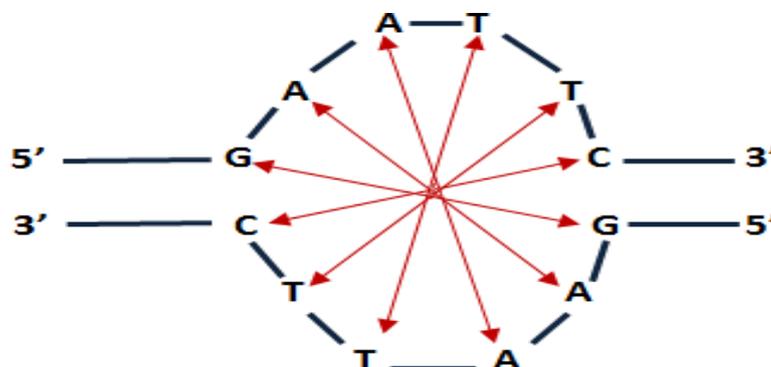


Fig.1. Axe de symétrie rotatoire du site de coupure *EcoRI*.

Le site de coupure, compris dans le site de reconnaissance est représenté par une flèche verticale (tab.1), et les produits de la digestion d'un génome par les enzymes de restriction sont appelés les fragments de restriction. Selon la position de la coupure (dans l'axe ou loin de l'axe) on distingue deux types de coupure:

- Coupure **franche** : Dans l'axe  Extrémités franches
- Coupure **cohésive** (collant) : N'est pas dans l'axe.  Extrémités cohésives

Dès 1953, on avait observé que lorsque des molécules d'ADN provenant d'une souche d'*E.coli* sont introduites dans une autre souche, elles ne sont que très rarement exprimées. En fait, l'ADN étranger est la plupart du temps rapidement coupé en petits fragments par une enzyme dite de restriction. Pour qu'il puisse se répliquer dans une nouvelle souche bactérienne, l'ADN introduit doit être protégé par une enzyme de modification qui ajoute des groupements méthyles à l'ADN.

En accord avec ces expériences sur *E. coli*, Hamilton Smith à l'Université Johns Hopkins s'aperçoit fortuitement que la bactérie *Haemophilus influenzae* dégrade rapidement un ADN étranger alors que son propre ADN reste intact. Cette découverte l'a amené à purifier *HindII*, la première enzyme de restriction coupant à un site spécifique et responsable de la dégradation de l'ADN étranger.

Donc ces enzymes participent à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus "système de restriction méthylation" (fig. 2). Les endonucléases de restriction coupent l'ADN étranger à des sites spécifiques. Et afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par les enzymes, une méthylase, codé par le gène de méthylation, va méthyler l'ADN au niveau des sites de coupure pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

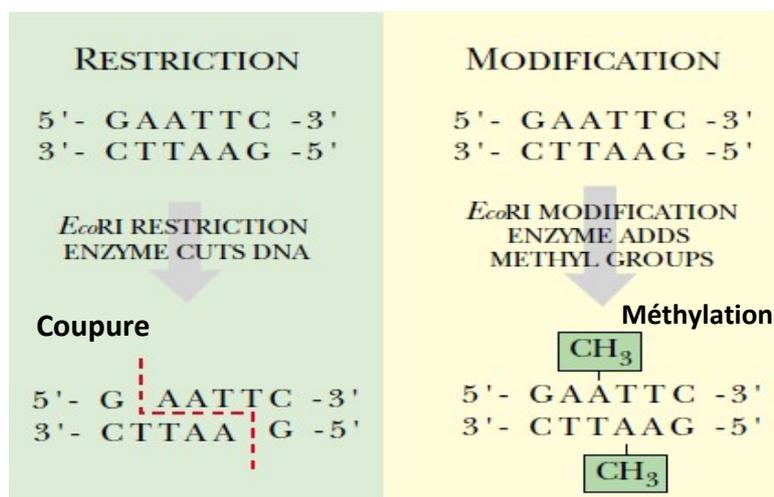


Fig.2: Systèmes de restriction et de méthylation.

1-2- Classification des enzymes de restriction

Les enzymes sont souvent des protéines présentant des propriétés de catalyse spécifique d'une réaction chimique. Elles sont réparties en 6 classes :

E.C. 1 Oxydoréductases: catalysent les réactions redox.

E.C. 2 Transférases: transfèrent d'un groupement fonctionnel.

E.C. 3 Hydrolases: catalysent l'hydrolyse de différentes liaisons.

E.C. 4 Lyases: Coupe des liaisons variées sans réaction d'hydrolyse ou de redox

E.C. 5 Isomérases: isomérisation au niveau de la même molécule

E.C. 6 Ligases: joins deux molécules par une liaison covalente.

1-3-Enzymes de restriction utilisées en génie génétique

Les enzymes de restriction de type II sont pratiquement les plus utilisées en génie génétique, à cause de leurs propriétés de coupure et de reconnaissance. Le E.C. de ces enzymes est le suivant: **E.C.3.1.21.4.**

Nom Commun: Les endonucléases de restriction de type II

Réaction: Coupure à l'intérieur de la séquence d'ADN db au niveau des sites de reconnaissance et de coupure spécifiques, générant des fragments d'ADN double brin se terminant par 5'-phosphate.

2 (classe): Hydrolase

1 (sous classe): Agissent sur les liaisons esters (**Estérases**)

21 (sous-sous classe): Leurs produits gardent leurs phosphates **5'**initial

4 : Nécessite la présence de **Mg⁺⁺** dans le milieu.

Réaction générale

ADN (Substrat) ADN digéré : Produit de digestion
(H₂O, énergie, Enzyme, Mg⁺⁺)

La réaction générale catalysée par les enzymes de restriction (E.C.3.1.21.n) implique la présence dans le milieu des facteurs suivants.

- **Enzyme** (E.C.3.1.21.n)
- **Substrat** ADN double brin non digéré
- **Cofacteur** : En général, seul le **Mg⁺⁺** est indispensable. Quelques enzymes de restriction font appel à d'autres cofacteurs. Les enzymes de méthylation ont pour coenzymes le S-adénosyl-Méthionine.
- **Facteurs physico-chimiques:** Ces facteurs contrôlent aussi ces réactions, **pH**, potentiel d'oxydoréduction, **forces ioniques**. L'énergie libre dégagée par l'hydrolyse est suffisamment importante pour que la réaction ne soit pratiquement pas réversible dans les conditions habituelles.
- Différents tampons sont utilisés pour les enzymes de restriction permettant l'optimisation des réactions de multiples enzymes avec le même tampon (pH:7- 7.9, PotOxyRed : dithiothreitol 1mM, Force ionique : NaCl ou CH₃COOK de 0 à 100mM ; varient d'un tampon à l'autre).

Exemples d'enzymes de restriction de type II

1- **EcoRI** : E.C. 3.1.21.4: C'est la deuxième enzyme caractérisée et identifiée chez *E. coli* souche R, le site de reconnaissance et de coupure est formé de six paires de bases (nucléotides).

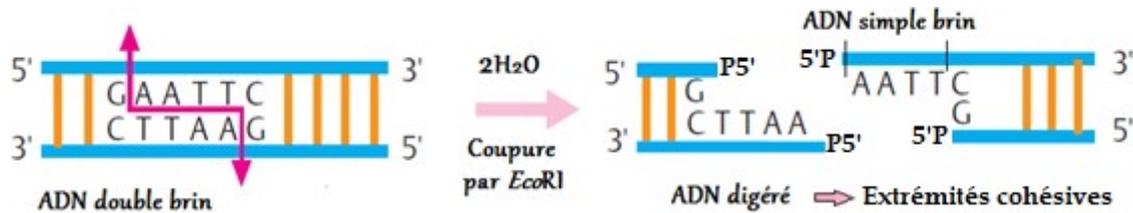


Fig.3: Coupure de l'ADN double brin par *EcoRI*, générant des extrémités cohésives.

2- **HaeIII**: C'est la troisième enzyme de restriction caractérisée et identifiée chez la bactérie *Haemophilus aegypticus*.

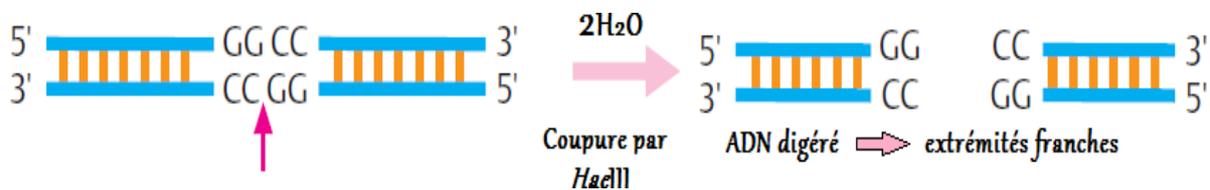


Fig.4: Coupure de l'ADN double brin par *HaeIII*, générant des extrémités franches.

1-4 Utilisation des endonucléases de restriction pour établir la mappe de restriction

La figure au dessous montre la digestion d'un fragment d'ADN de 5 kb par deux enzymes de restriction (*Bam*HI et *Eco*RI).

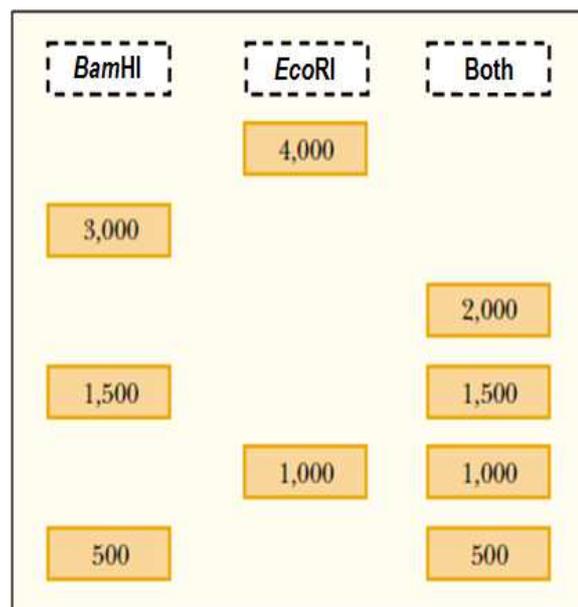


Fig.5: Gel d'agarose des produits de digestion d'un fragment de 5kb par deux enzymes de restriction.

L'analyse des résultats de la digestion (fig. 5) nous permet de déterminer les différentes possibilités de la localisation des sites de restriction pour chaque enzyme (fig. 6 et 7).

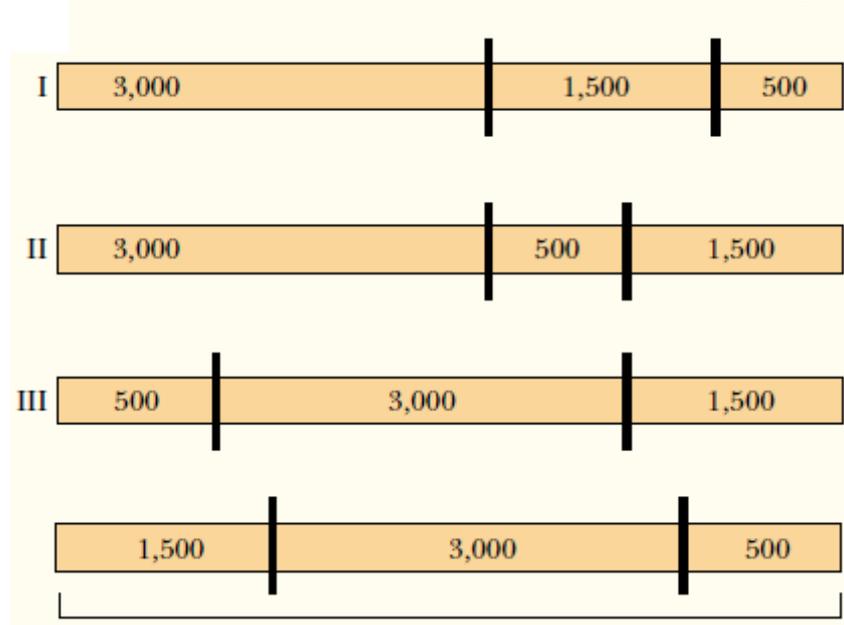


Fig.6: Les différentes possibilités de la localisation des sites de coupure par *Bam*HI.

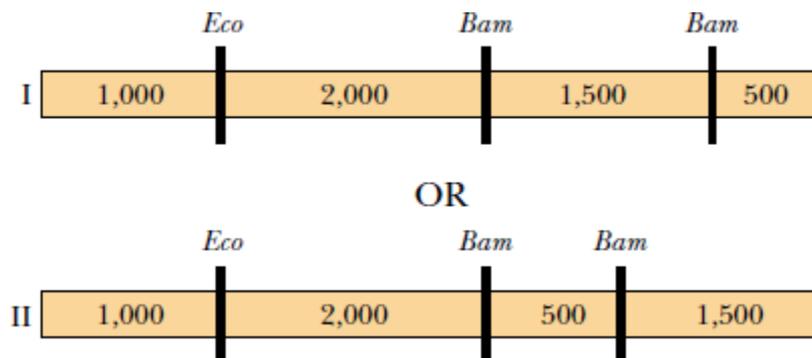
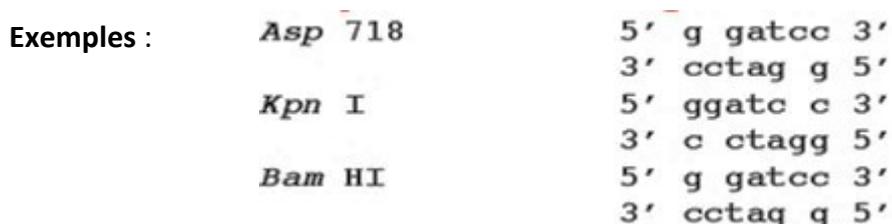


Fig. 7: Les différentes possibilités de localisation des sites de restriction des deux enzymes (*Eco*RI, et *Bam*HI).

1-5- Isoschizomères et famille d'enzymes:

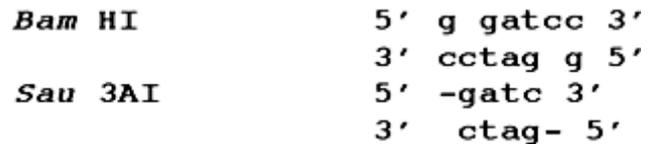
En général, des enzymes de restriction différentes reconnaissent des séquences différentes. Cependant, plusieurs enzymes isolées d'organismes différents reconnaissent des séquences identiques. On les appelle isoschizomères. Ceux-ci ne coupent pas toujours la séquence reconnue au même endroit.



Une famille d'enzymes est caractérisée par le fait que tous les membres de cette famille produisent les mêmes extrémités, même si elles ont des séquences de reconnaissance différentes.

Exemples:

- **gatc** : *Sau 3AI*, *Bgl I*, *Bam HI*, *Bcl II*, *Xho II*.
- **ctag** : *Mae I*, *Spe I*, *Nhe I*, *Avr I*, *Xba I*.



1-6-Méthylation de l'ADN

La plupart des souches de *E. coli* contiennent deux enzymes qui méthylent l'ADN : la Dam méthylase et la Dcm méthylase.

1-6-1-Dam méthylase

La Dam méthylase méthyle l'adénine dans la séquence 5'-GA*TC-3'. Les sites de reconnaissance de plusieurs enzymes de restriction telles que *PvuI*, *BamHI*, *BclI*, *BglII*, *XhoII*, *MboI* et *Sau3AI* contiennent cette séquence de même qu'une certaine proportion des sites reconnus par *Clal* (1 site sur 4), *TaqI* (1 site sur 16), *MboII* (1 site sur 16) et *HphI* (1 site sur 16). Certaines enzymes ne coupent pas si l'adénine est méthylée. L'enzyme *MboI* ne coupe pas la séquence GATC si elle est méthylée tandis que l'enzyme *Sau3AI* reconnaît la même séquence que *MboI* et n'est pas affectée par la méthylation *dam*.

1-6-2-Dcm méthylase

Cette méthylase ajoute un groupement méthyle à la cytosine interne des séquences 5'-CC*AGG-3' et 5'-CC*TGG-3'. Une enzyme affectée par la *dcm* méthylation est *EcoRII*. On peut contourner le problème en utilisant *BstNI* qui reconnaît la même séquence qu'*EcoRII*, mais qui ne la coupe pas au même endroit. Si *BstNI* ne convient pas, on peut préparer l'ADN à partir de souches d'*E. coli* qui sont *dcm*-.

E.coli K contient au moins 3 systèmes de restriction différents dépendant de la méthylation qui reconnaissent leurs séquences cibles seulement lorsqu'elles sont méthylées : *mrr* (6-méthyladénine), *mcrA* (m5CG où m5C est la 5-méthylcytosine) et *mcrB* (Pum5C). Des fragments d'ADN méthylés à un de ces sites sont clonés inefficacement dans des souches sauvages de *E. coli*. Par exemple, comme les CG de l'ADN de mammifère sont largement méthylés *in vivo*, l'ADN humain est restreint par *mcrA*.

2- Enzymes de modification des acides nucléiques

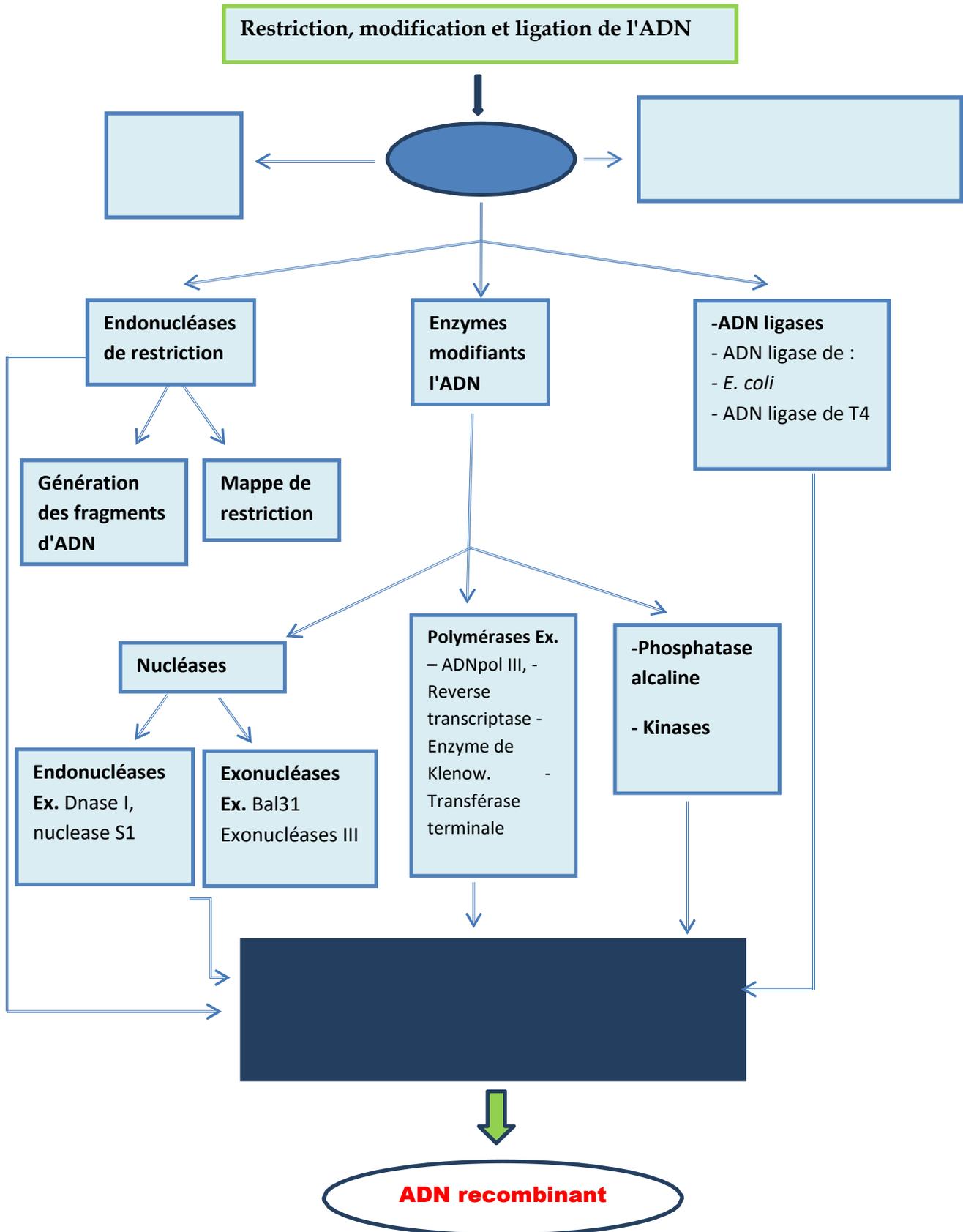


Fig.8: Carte de conception des enzymes utilisées en génie génétique

2-1- Ribonucléases A (RNase): EC3.1.27.5

Cette hydrolase agit comme une endonucléase, préférentiellement après les nucléotides à pyrimidines (U, C). En hydrolysant la liaison entre le phosphate et le carbone 5' du nucléotide suivant. Elle hydrolyse les ARN simple brin (inactive sur l'ARN double brin) jusqu'à un mélange d'oligonucléotides se terminant tous par un nucléotide à pyrimidine estérifié par un phosphate en 3'.

Il existe des inhibiteurs de l'RNase, Ex. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), des protéines extraites du placenta (ces inhibiteurs sont utilisés souvent pour protéger les ARN lors de l'extraction ou les réactions enzymatiques).

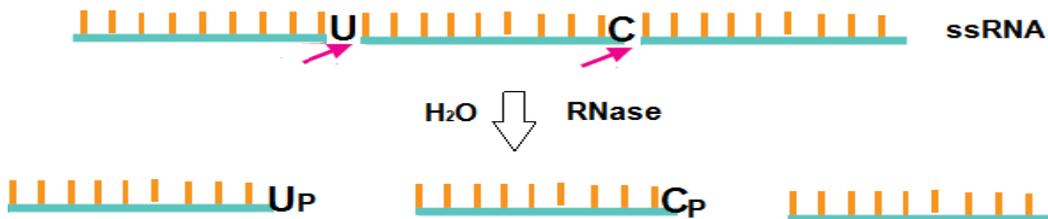


Fig.9: Digestion de l'ARN simple brin par l'RNase.

2-2- Désoxyribonucléase I (DNase I): EC 3.1.21.1

La DNase agit sur les liaisons adjacentes aux nucléosides pyrimidiques (C, T) des ADN simple ou double brin. L'activité de cette enzyme est dépendante de la présence du Mg^{++} ou Mn^{++}

- Mg^{++} : Hydrolyse au hasard
- Mn^{++} : Hydrolyse dépendante de la séquence

Elle est utilisée pour l'analyse des sites de liaison protéines –ADN par la technique de foot-printing (empreinte de pas). Car la protéine liée à l'ADN le protège de l'hydrolyse par cette enzyme (fig. 10). Cette enzyme est extraite du pancréas de bœuf.

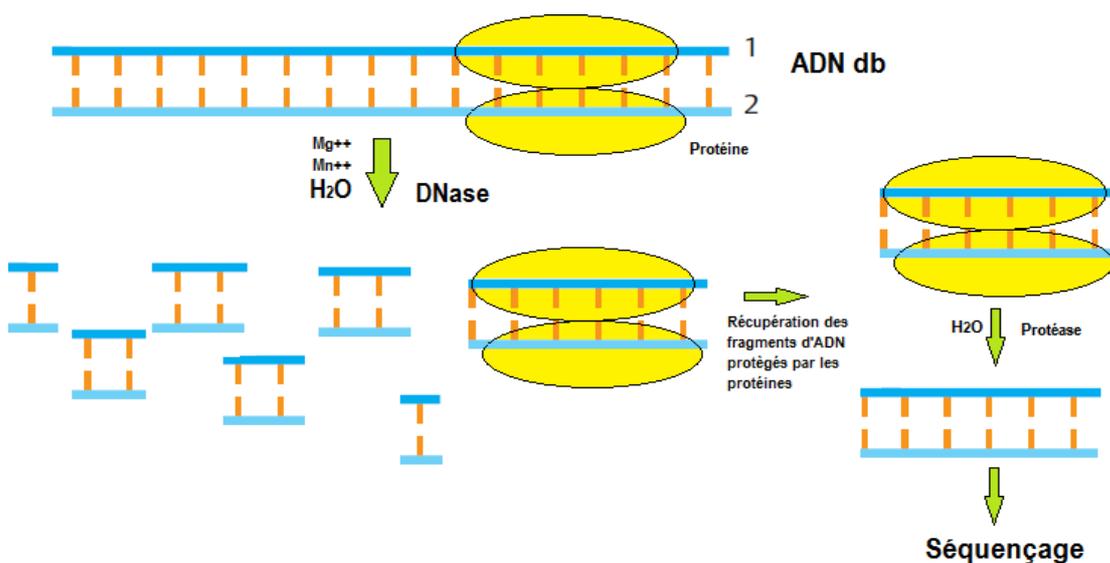


Fig.10: Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de "foot printing".

2-3- Nucléase S1 : EC 3.1.30.1

La nucléase S1 est une métalloprotéine (PM: 32000 Da) produite par le champignon *Aspergillus oryzae*, c'est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin, bien qu'à des concentrations élevées elle agit sur les hybrides. Elle agit en milieu acide (pH 4-4.3) en présence d'ion Zinc (Zn^{++}). L'activité de cette enzyme diminue avec l'augmentation du pH (diminution de 50% à pH 4.9), et aussi avec la diminution de la concentration du phosphate libre. Cette métallo-enzyme est inhibée par les agents chélateurs (Ex. EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid). Elle est utilisée en plusieurs applications:

- Pour faire des bouts francs aux extrémités des fragments d'ADN double brin.
- Pour hydrolyser les fragments d'ADN simple brin au niveau des brèches (même qu'il manque une seule liaison).
- Pour ouvrir les épingle-à-cheveux formés lors de la synthèse de l'ADNc.
- Pour isoler des hybrides ADN/ADN, ADN/ARN, ou ARN/ARN. C'est un outil de choix pour mesurer le taux d'hybridation.

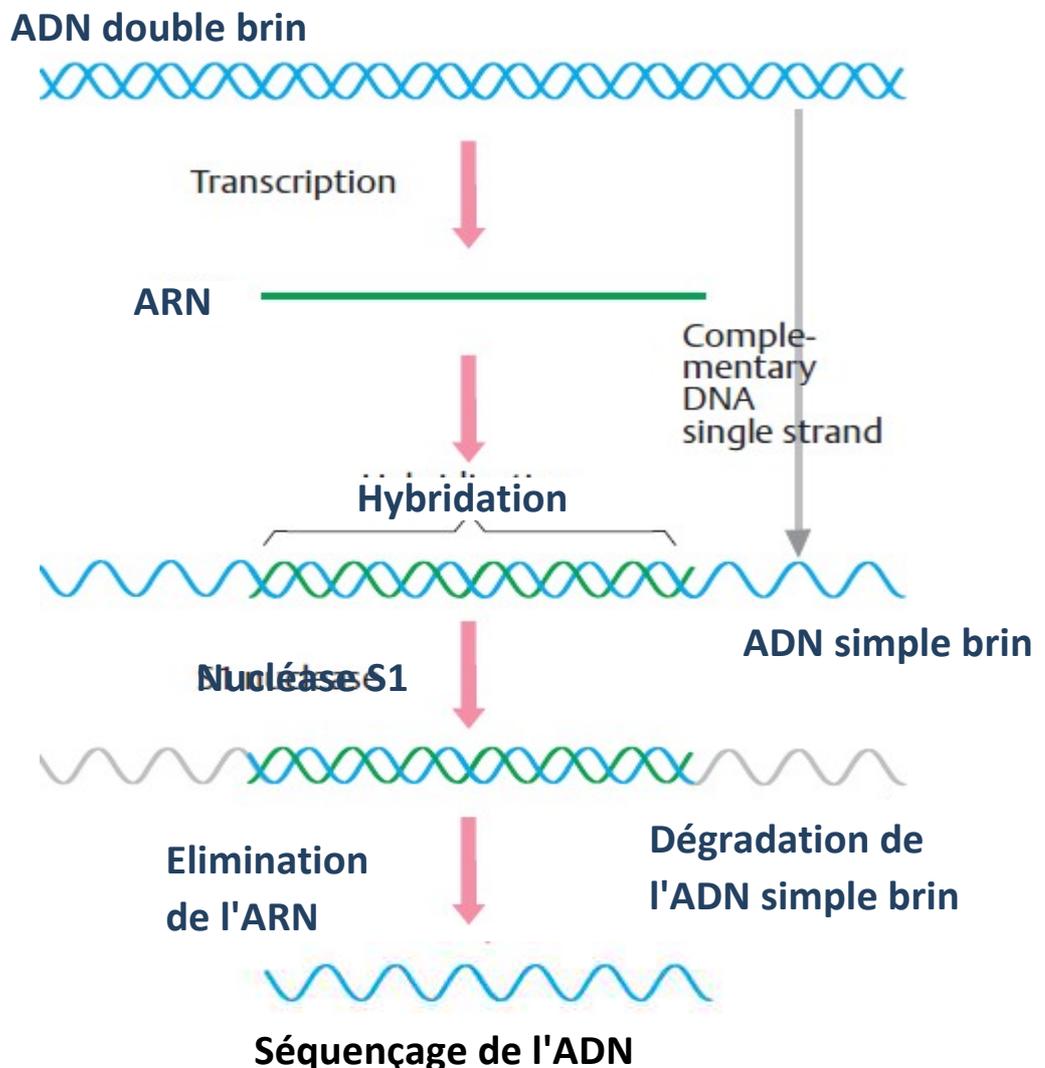


Fig.11: L'utilisation du nucléase S1 pour la détermination du site d'initiation de la transcription (Passarge, 2007).

2-4- Exonucléase de phage λ: EC 3.1.11.3

L'exonucléase de phage λ, elle est aussi rencontrée chez le T4 ou T7, ainsi que chez les animaux (DNase IV) hydrolyse de préférence les extrémités 5'-phosphate des DNA double brin en continuant vers le côté 3' (5' → 3' exonucléase). Elle produit des nucléosides 5'-phosphate (fig. 12). Cette enzyme est produite par les cellules bactériennes infectées par les phages.

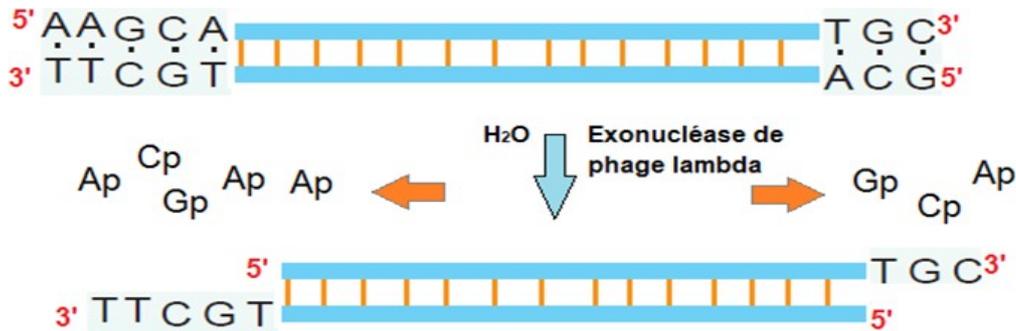


Fig. 12: Hydrolyse des extrémités 5' de l'ADN db par l'exonucléase de phage λ.

I-2-5 Exonucléase III: EC 3.1.11.2

Cette enzyme produite par *E. coli*, et aussi par *Haemophilus influenza*, au contraire de l'exonucléase de phage λ, hydrolyse de préférence les extrémités 3' des ADN doubles brin en remontant vers le côté 5' (3' → 5' exonucléase). Elle produit des nucléotides 5'-phosphate (fig.13). Cette enzyme peut hydrolyser aussi un radical phosphorylé lié à la fonction 3'-OH du dernier nucléotide (action phospho-mono-estérase).

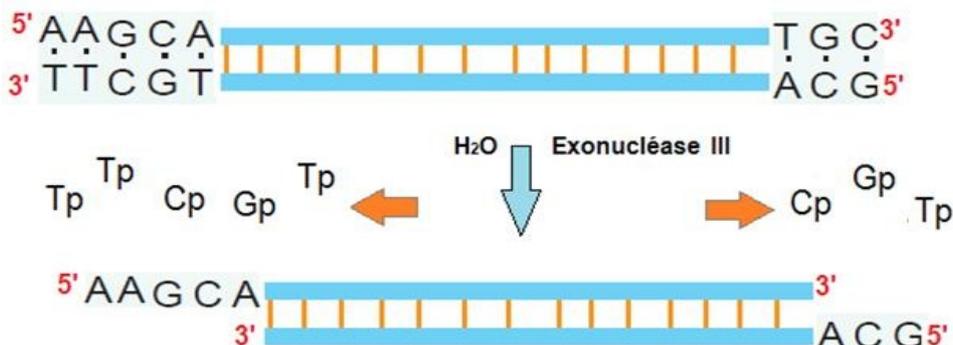


Fig.13: L'hydrolyse des extrémités 3' de l'ADN db par l'exonucléase III.

2-6-Ribonucléase T1: EC 3.1.27.3

Cette nucléase est produite par *Aspergillus oryzae*, elle a un PM de 11000 Da, et hydrolyse spécifiquement les ARN sb en rompant les liaisons 3'-5' phosphoester en aval des GMP, de telle manière que le produit soit une guanosine 3'-phosphate ou un oligonucléotide se

terminant par une guanosine 3'-phosphate (fig. 14). Cette enzyme est utilisée surtout dans le séquençage des ARN.

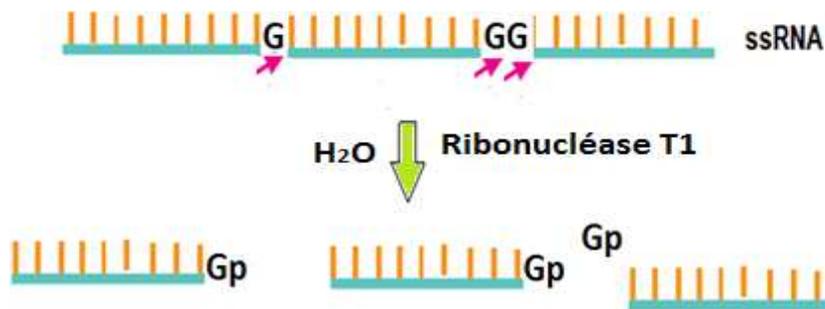


Fig.14: L'hydrolyse de l'ARN sb par la ribonucléase de T1.

2-7- Ribonucléase T2

Cette nucléase comme celle T1 est produite par *Aspergillus oryzae*, elle a un PM de 36000 Da, et hydrolyse spécifiquement les ARN sb en rompant les liaisons 3'-5' phosphoester en aval de l'adénosine (AMP) (fig. 15). Elle est utilisée aussi dans le séquençage de l'ARN.

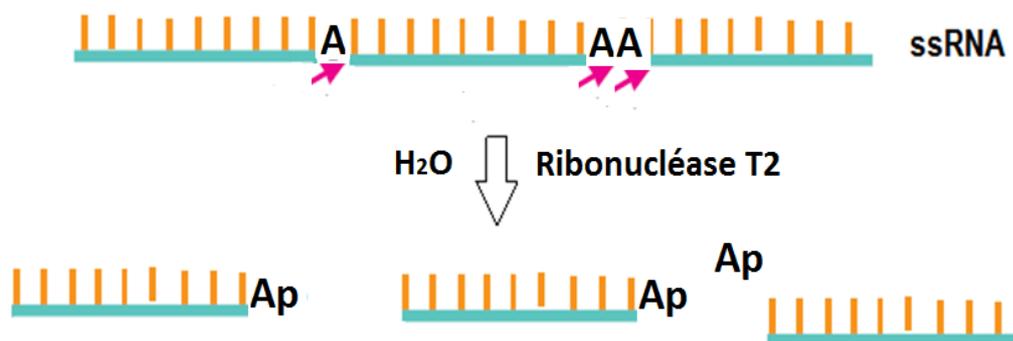


Fig.15: Hydrolyse de l'ARN sb par la ribonucléase T2.

2-8-Nucléase Bal31

Cette enzyme multifonctionnelle est produite par *Alteromonas espejiana*. Elle possède à la fois:

- Activité **exonucléase** hydrolysant simultanément les deux extrémités 3' et 5' de l'ADN db.
- Activité **endodésoxyribonucléase** hautement spécifique des ADN sb.

La Bal31 agit séquentiellement, comme exonucléase dans les sens 3' → 5' puis par élimination endonucléotidique des simples brins sortants (fig. 16).

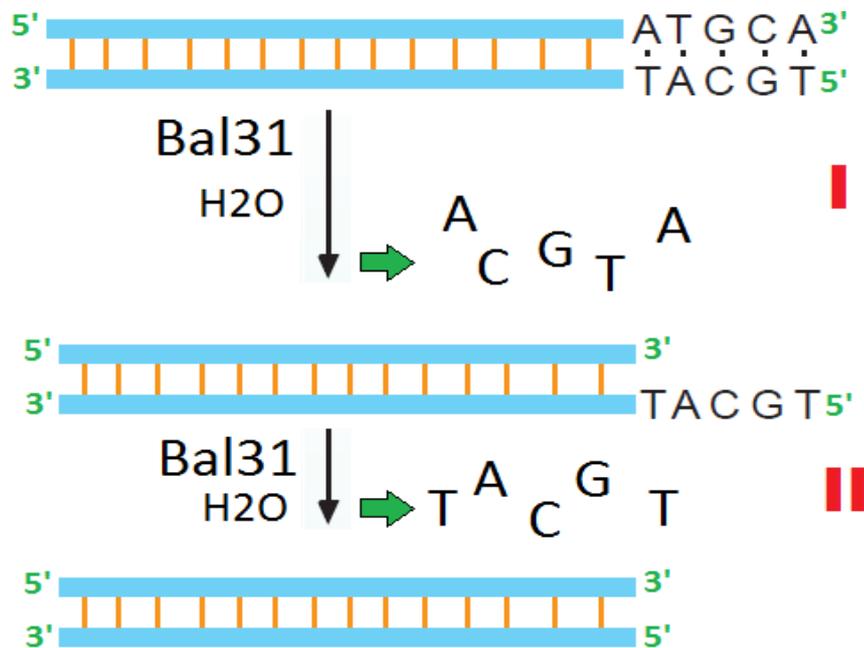


Fig.16: Activité exonucléase sur l'extrémité 3' puis endonucléase sur le fragment simple brin sortant du BAL31 sur l'ADN.

2-9- ADN ligase

La ligation entre deux molécules d'ADN par une liaison covalente entre l'extrémité 3'-OH d'un brin et celle 5'-phosphate de l'autre brin est le résultat de l'action d'une ligase. Cette réaction nécessite la consommation d'une molécule d'ATP.

L'ADN-ligase d'*E. coli* et celle du phage T4 sont les plus utilisées en génie génétique. La première utilise le NAD comme cofacteur et la deuxième utilise l'ATP et le Mg⁺⁺.

La quantité de l'ADN ligase nécessaire dans chaque réaction et l'activité de cette enzyme dépendent de certains nombre de facteurs:

- Nature des fragments d'ADN à ligaturer (extrémités franches ou cohésives).
- Longueur d'extrémités cohésives.
- Stabilité des liaisons hydrogène.
- La température d'incubation.
- La concentration des fragments.

Exemple:

- La vitesse de ligation des fragments de restriction de pBR322, de même longueur et tous à extrémités cohésives, varie selon la séquence de ces extrémités.

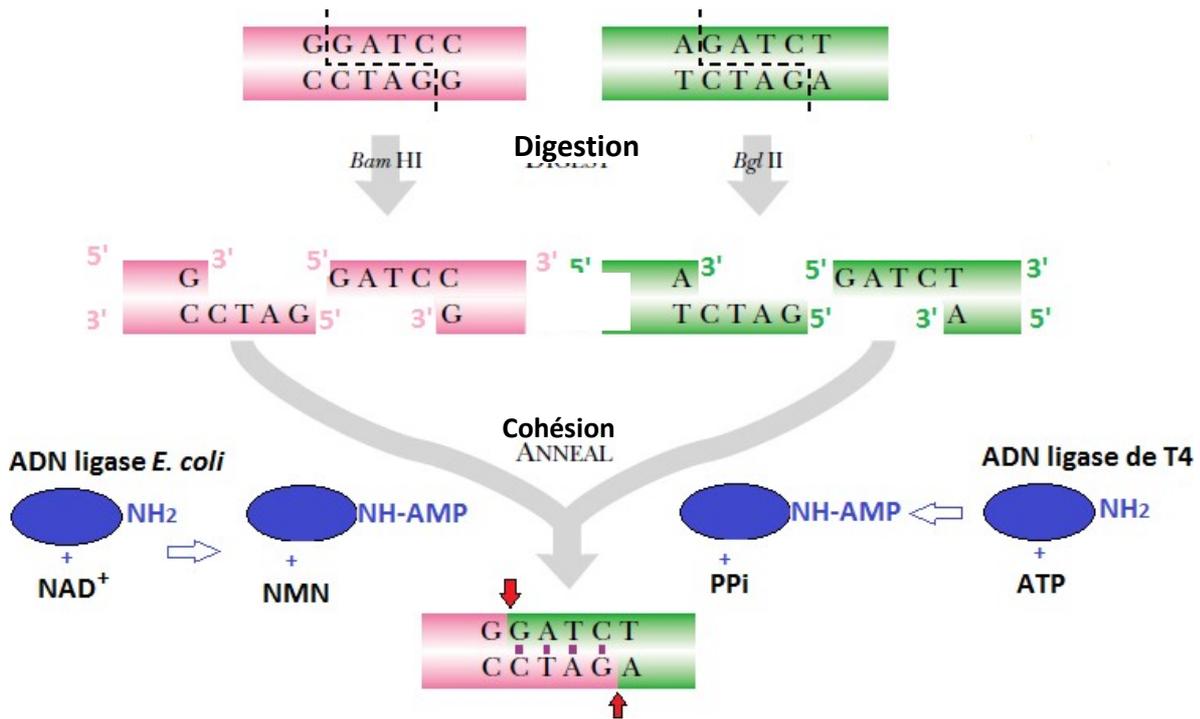


Fig.17: L'une des modalités de l'utilisation des ligases en génie génétique (ligation des extrémités cohésives des enzymes de restriction). L'enzyme ligature les extrémités 3'-OH et 5'-phosphate. L'ADN ligase est adénylée par NAD (*E. coli*) ou par l'ATP (phage T4). Après l'adénylation, l'extrémité 5' phosphate favorise la formation de liaison phosphoester par attaque nucléophile ($^-\ddot{O}H$).

Génie génétique

Chapitre II

Hôtes de clonage

En biotechnologie, le génie génétique est utilisé à des fins commerciales comme pour la production de nouveaux vaccins, des 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 orientera vers un type de vecteur adapté.

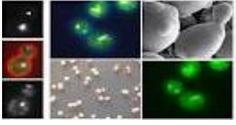
1- L'hôte idéal

Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit

- Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- Être non pathogène.
- Être capable d'incorporer l'ADN.
- Être stable en culture
- Possède des enzymes appropriées pour la réplication du vecteur.

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

Tab.1: Hôtes de clonage moléculaire.

<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Procaryotes		Eucaryotes
Bacille à Gram – 	Bacilles à Gram + Spore +	
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue. - Nombreuses souches disponibles - Procaryote le plus connu 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilement transformable - Non pathogène - Protéines secrétés naturellement - Formation d'endospores facilitant les cultures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue - Non pathogènes - Assure la maturation des ARNm et des protéines - Facile à cultiver.
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> - Potentiellement pathogènes -Périplasma piégeant les 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement instable - Génétique moins connue 	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmides instables -Pas de réplication pour la

protéines	qu' <i>E. coli</i>	plupart des plasmides procaryotes.
-----------	--------------------	------------------------------------

Il faut noter que *E. coli* est l'organisme le plus utilisé en clonage moléculaire. Malgré que cette bactérie soit comptée parmi la flore normale de l'intestin de l'homme et les animaux, il est aussi un pathogène potentiel (surtout les souches sauvages). Et aussi la synthèse d'endotoxines (LPS) susceptible de contaminer les produits finis, cela constitue un problème potentiel notamment pour les produits pharmaceutiques administrés par voie intraveineuse.

Aussi le problème, que *E. coli* retiens des protéines extracellulaires dans son espace périplasmique, ce qui peut rendre l'isolement et la purification des protéines recombinantes difficiles et coûteuse.

Avec *Bacillus subtilis* l'inconvénient majeur reste la difficulté de maintenir la réplication plasmidique dans les sous cultures, ce qui engendre souvent la perte de l'ADN cloné.

Des vecteurs plasmidique et des YAC (Yeast Artificial Chromosome) ont été développés pour le clonage dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'avantage que présente cet hôte est qu'il possède les ARN et les systèmes post traductionnels complexes nécessaire à la synthèse de produits de gènes d'organismes supérieurs. Les processus post traductionnels peuvent être à l'origine de problème de clonage.

La culture de cellules de mammifères présente un coût élevé et des difficultés de production à grande échelle. En plus le niveau d'expression des gènes clonés est souvent faible (aussi pour les insectes, plantes, etc.).

On dit dans les cas des bactéries transformation, le processus d'intégration de l'ADN étranger, mais pour les eucaryotes on dit la transfection. Car, la transformation des cellules de mammifère désigne habituellement la conversion en cellules malignes (tumoraux, cancéreuses). L'exemple le plus connu de l'application de cette caractéristique en biotechnologie est la production des anticorps monoclonaux.

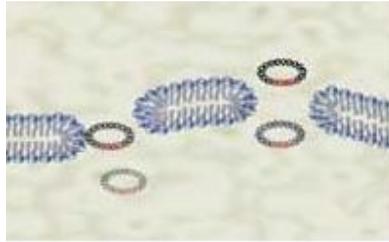
2- Méthodes d'introduction de l'ADN à cloner dans la cellule hôte

Il y'a plusieurs méthodes sont largement utilisées pour introduire l'ADN dans les cellules hôtes.

N.B. Chez les bactéries on peut transférer l'ADN à cloner par trois méthodes: la transformation, la transduction et la conjugaison (voir cours génétique microbienne).

2-1- Électroporation

Cette technique implique l'exposition de l'hôte à des décharges électriques afin d'ouvrir les pores (temporairement) dans la membrane par lesquels, l'ADN cloné, ajouté dans le milieu, peut pénétrer sans lyse des cellules (Fig. 1).



Électroporation

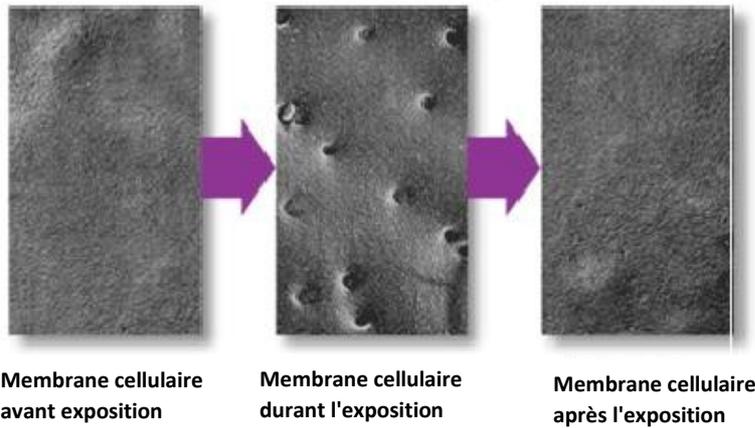


Fig.1: A : Représentation graphique des plasmides en passant par les pores aqueux dans la membrane plasmique. B : Phénomène d'électroporation.

2-2- Un canon à Particules

La transfection des cellules cibles se fait par des billes métalliques (généralement de tungstène) recouvertes d'acides nucléiques, en perçant parois et membranes plasmiques sans provoquer de lyse cellulaire. Cette technique a été utilisée sur des levures, des algues, des cellules de plantes et même des mitochondries et chloroplastes. De plus contrairement à l'électroporation, cette technique peut être utilisée pour introduire de l'ADN dans des tissus intacts comme des graines de plantes.