**CHAPITRE 2 : LES OUTILS DE LA GENOMIQUE**

Le génie génétique englobe un ensemble de concepts et de techniques qui permettent d’étudier et de modifier les gènes et leurs fonctions, au cœur même du fonctionnement des cellules et des organismes vivants. Ces outils, qui se sont développés au cours des trente dernières années grâce aux découvertes de la biologie moléculaire, ont permis des avancées remarquables dans notre compréhension du monde vivant. Ils sont également à la base des programmes de génomique, grâce à l’amélioration et l’automatisation des techniques existantes, mais aussi au développement de techniques nouvelles.

1. **Isoler l’ADN**

L’ADN est une molécule complexe mais on peut l’isoler relativement facilement des tissus vivants, grâce à ses propriétés chimiques particulières. Chez les plantes (et les autres eucaryotes, organismes constitués de cellules à noyau), l’ADN chromosomique se trouve dans le noyau des cellules. Pour l’extraire, il faut, à partir d’un broyat de tissus, rompre les membranes de la cellule et du noyau pour libérer les chromosomes, par exemple en utilisant un détergent. L’ADN peut alors être isolé en utilisant le fait que les sels d’ADN sont insolubles dans l’alcool (ils forment un précipité).

1. **Couper-coller l’ADN**

Les molécules d’ADN constituant les chromosomes sont beaucoup trop longs, complexes et fragiles pour être analysées facilement. Au laboratoire, on préfèretravailler sur de petits fragments contenant un ou quelques gènes.On peut facilement mesurer la taille de ces fragments d’ADN par migration sur des gels d’électrophorèse.

Des protéines bactériennes découvertes, les enzymes de restriction, ont la particularité de couper l’ADN en des points spécifiques. Ces molécules du monde vivant reconnaissent une succession précise de quelques nucléotides de l’ADN et le coupent au niveau de ce site. Cette étape de coupure est souvent appelée digestion de l’ADN. Grace à d’autres enzymes, on peut également recoller des morceaux d’origines variées et réaliser de nouveaux assemblages génétiques, dans le but d’éprouver des hypothèses scientifiques ou de conférer une nouvelle propriété à l’organisme étudié (par exemple, faire synthétiser de l’insuline par une bactérie).

1. **Recopier l’ADN**

Pour analyser l'ADN et comprendre sa structure, il est nécessaire de soumettre un même fragment à de nombreuses opérations, réalisées chacune sur plusieurs exemplaires. Cela suppose de pouvoir disposer d'un grand nombre de copies de l'ensemble des fragments d'une molécule d'ADN.D’autres enzymes bactériennes, les polymérases, ont la particularité de recopier les molécules d’ADN à partir de l’identique. Si on leur ajoute deux petits morceaux d’ADN (les amorces) encadrant une région d’ADN, on peut multiplier très rapidement, au laboratoire, cette région d’ADN : c’est la technique d’amplification, ou PCR (Polymerase Chain Reaction), facile à automatiser à grande échelle, et largement utilisée par la génomique.

1. **Séquencer l’ADN**

La molécule d’ADN est constituée d’un enchainement de quatre nucléotides : A, C, G, T, qui constituent l’alphabet à quatre lettres du code génétique. Déterminer l’ordre des nucléotides, la séquence d’une région d’ADN, donne accès à l’information génétique de base et permet d’étudier les gènes présents dans cette région et donc les protéines pour lesquels ils codent. Pour séquencer une molécule d’ADN, les biologistes utilisent une technique enzymatique qui consiste à recopier un brin d’ADN (la matrice) in vitro, en ajoutant dans la réaction des nucléotides modifiés qui, quand ils sont incorporés, bloquent l’élongation de la copie. En lisant la longueur de ces chaines bloquées après une électrophorèse, on peut reconstituer l’enchainement des nucléotides sur le brin d’ADN matrice. Toutefois, la longueur des fragments que l’on peut analyser ne dépasse pas quelques centaines de nucléotides, et pour séquencer de plus grandes molécules d’ADN, il est nécessaire de les fragmenter avant de les lire. L’ordinateur se charge par la suite de reconstituer la séquence complète en assemblant les fragments qui se chevauchent. De nos jours, une grande partie de ces opérations est réalisée de façon automatique par des robots de séquençages, secondés par des programmes informatiques qui nécessitent de grandes capacités de calcul.

1. **Reconnaitre son semblable**

Une autre technique abondamment utilisée dans les expériences de génétique moléculaire repose sur la complémentarité des deux brins de la molécule d’ADN ou sur la complémentarité entre une molécule d’ADN et une molécule d’ARN complémentaire.

Lors de l’hybridation moléculaire, des fragments d’ADN ou d’ARN (ou sonde), marqués par un traceur radioactif ou fluorescent sont employés pour détecter la présence d’une séquence proche (ou homologue) dans un mélange complexe, par exemple un génome entier.

1. **Stocker l’ADN : clonage et banques**

Chez les plantes, la quantité d’ADN composant le génome varie beaucoup selon les espèces. Chez certaines (comme Arabidopsis ou le Riz), cette quantité se chiffre en centaines de millions de nucléotides ; chez d’autres comme le maïs, on s’adresse à des tailles plutôt de l’ordre du milliard, voire de la centaine de milliards pour certaines. Les génomes sont donc en général des objets trop complexes pour être manipulés facilement par le généticien. Il est nécessaire de les découper en morceaux facilement stockables et manipulables : on constitue alors une banque de fragments, chaque fragment étant introduit et multiplié indépendamment dans un hôte, bactérie ou levure. Il faut bien sur disposer d’un grand nombre de fragments pour avoir une bonne chance que chaque région du génome soit représentée dans une banque. Bien entendu, plus le génome est de grande taille, plus cette banque doit comporter de fragments ; c’est en partie pour cela que les génomiciens préfèrent travailler sur des génomes les plus simple possibles, comme ceux de l’arabette ou du riz.

1. **La transgénèse**

Les techniques du génie génétique permettent l’isolement, l’étude et la modification des gènes dans des tubes à essai (in vitro).bien sûr, il est souvent nécessaire de réintroduire ces gènes modifiés (construction génétique) ou non dans un organisme vivant afin de vérifier leur fonction ; on utilise alors une technique dite de transformation, ou transgénèse, pour introduire ces constructions dans le génome de l’espèce étudiée.

Deux méthodes sont utilisées pour introduire une construction dans un génome de plante.

 **La première méthode** : utilise les fonctions de la bactérie *Agrobacterium*. Les propriétés de transfert d’ADN de cette bactérie dans les cellules végétales ne sont connues que depuis 1977, mais sont utilisées depuis des millions d’années par *Agrobacerium* pour coloniser les cellules végétales. *Agrobacterium tumefaciens* est capable d’introduire dans certaines plantes des gènes bactériens susceptibles d’induire la multiplication anarchique des cellules transformées au point d’infection : c’est la maladie de la galle de collet.

Afin d’utiliser cette bactérie pour des expériences de transformation et pouvoir régénérer des plantes entières à partir des cellules transformées, les bactéries sont débarrassées des gènes responsables de la formation de galle, mais elles conservent la faculté de transférer vers le génome de la plante réceptrice une séquence d’ADN, l’ADN-T (ou l’ADN transféré) dans lequel on aura inséré le gène d’intérêt. Les bactéries porteuses de la construction génétique sont alors mises en contact direct avec les tissus de la plante pour transformer certaines des cellules de ces tissus. Chez un grand nombre d’espèces, il est maintenant possible de régénérer une plante entière à partir d’une cellule. C’est ainsi que l’on obtientune plante transgénique, en régénérant un individu entier à partir d’une cellule transformée.

**La seconde méthode :** dite de transfert direct, est utilisée pour les plantes récalcitrantes à l’infection par *Agrobacterium*, ou pour lesquelles il est difficile de régénérer un individu à partir d’une cellule. Elle requiert un canon à particules, qui permet de bombarder un tissu végétal (feuille, tige, apex, embryon….) avec des microbilles couvertes de l’ADN de la construction génétique, à une vitesse si importante qu’elle permet à ces billes de pénétrer dans la cellule en traversant sa paroi. L’ADN solubilisé dans le cytoplasme peut alors, dans certains cas, aller s’insérer dans le génome de la plante. Les cellules transformées des tissus pourront également donner naissance à une plante entière, comme nous l’avons vu précédemment. Lorsqu’un apex ou un embryon ont été ainsi traité et que l’on cultive cet organe pour obtenir une plante entière, si certaines cellules à la base de la formation des organes reproducteurs de la plante ont été transformées, il est possible d’obtenir dans la descendance de cette plante des individus dont toutes les cellules sont transformées.