

Introduction

Le génie génétique est 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, ont permis des avancées remarquables dans la 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. Le matériel de base du génie génétique est la molécule d'ADN, cette molécule doit subir un ensemble de techniques et de traitements pour être étudiée et analysée

1- Isoler l'ADN

L'ADN est une molécule complexe qu'on peut, grâce à ses propriétés chimiques particulières, l'isoler facilement des tissus vivants. Les plantes qui sont des eucaryotes, ont un ADN chromosomique se trouve dans le noyau des cellules ; pour l'extraire, il faut rompre les membranes cellulaires et nucléaire pour libérer les chromosomes (on utilise un détergent). En se basant sur le fait que les sels d'ADN forment un précipité dans l'alcool puisque ils sont insolubles, l'ADN peut alors être isolé facilement

2- Couper-coller l'ADN

Les molécules d'ADN constituant les chromosomes sont trop longs, complexes et fragiles pour être analysées facilement. Au laboratoire, on préfère travailler sur de petits fragments contenant un ou quelques gènes. La taille de ces petits fragments d'ADN est facilement mesurable par migration sur des gels d'électrophorèse.

Les enzymes de restriction sont un outil de biologie moléculaire utilisé pour couper l'ADN en fragments de taille réduite en des points spécifiques. Ces enzymes reconnaissent une succession précise de quelques nucléotides de l'ADN et le coupent au niveau de ce site.

3- Recopier l'ADN

Pour analyser l'ADN et comprendre sa structure, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de copies de l'ensemble des fragments de la molécule d'ADN, pour pouvoir soumettre le même fragment à de nombreuses opérations réalisées chacune sur plusieurs exemplaires. C'est-à-dire on doit amplifier les fragments d'ADN. Pour ça on utilise d'autres outils de biologie moléculaire qui ont la capacité de recopier les molécules d'ADN à partir de l'identique, ce sont les polymérase. Ces enzymes sont utilisées dans la technique

d'amplification, ou PCR (Polymerase Chain Reaction) pour multiplier très rapidement, au laboratoire une séquence d'ADN

4- Séquencer l'ADN

La molécule d'ADN est constituée d'un enchainement de quatre nucléotides : A, C, G, T. Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchainement des nucléotides dans un fragment d'ADN. Cette séquence donne l'accès à l'information génétique de base et permet d'étudier les gènes présents dans cette molécule et donc les protéines pour lesquels ils codent. Pour séquencer une molécule d'ADN, plusieurs techniques sont élaborées, mais la technique enzymatique de Sanger est la plus utilisée, elle 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 (voir détaille dans le chapitre de séquençage).

5- Reconnaître son semblable

La complémentarité entre deux brins d'ADN ou entre un brin d'ADN et un brin d'ARN complémentaire est une technique très utilisée dans les expériences de génétique moléculaire. 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 (un génome entier).

6- Stocker l'ADN clonage et banques

Chez les plantes, la quantité d'ADN composant le génome varie selon les espèces (en centaines de millions de nucléotides comme *Arabidopsis* ou le Riz à des milliards, voire de la centaine de milliards pour certaines). Les génomes sont 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.

7- La transgénèse

Les techniques du génie génétique permettent l'isolement, l'étude et la modification des gènes dans des tubes à essai (*in vitro*). 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 transgénése, pour introduire ces constructions dans le génome de l'espèce étudiée.

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

7.1 Transfert indirect des constructions génétiques

Utilise les fonctions de la bactérie *Agrobacterium*. Cette bactérie 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-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.

7.2 Transfert indirect des constructions génétiques

Cette méthode 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.

8- Les outils de la génomique structurale

8.1 La cartographie

Elle consiste à se repérer sur le génome grâce à des balises (= marqueurs). Les activités de cartographie sont classiquement subdivisées en cartographie génétique et cartographie physique. La cartographie génétique, basée sur l'analyse de ségrégation, consiste à positionner de façon relative des locus, avec comme objectif la mise en évidence de liaisons avec des caractères d'intérêt. La cartographie physique, quant à elle, cherche à déterminer la distance réelle en nucléotides entre locus et a pour objectif ultime le séquençage complet du génome. La distance physique entre deux marqueurs constitue donc une mesure absolue,

contrairement à la mesure relative des cartes génétiques. Le lien entre ces deux approches complémentaires est assuré par la cartographie chromosomique, dont l'objectif est l'assignation des éléments de cartographie génétique et physique à des chromosomes ou à des régions de chromosomes.

8.2 Le séquençage

Le séquençage d'un génome consiste en la détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN présent dans chaque cellule d'un organisme donné. Cette détermination est en général d'autant plus difficile que le génome étudié est grand et riche en séquences répétées