

République populaire et démocratique d'Algérie
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche



Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie

Taoufik KHAZNADAR

Département du cycle ingénieur

*Polycopié de la matière Amélioration des plantes par génie
génétique*

Niveau : Master 2

Spécialité : Biotechnologie végétale



Dr. NADJI Wassila

Fiche technique

Ce document est réparti en six chapitres et un (TD), le premier Chapitre est scindé en deux parties :

✚ **Partie 1** : généralité sur les outils de génie génétiques,

✚ **Partie 2** : le clonage moléculaire ;

Chapitre 2 : Identification et isolement des gènes d'intérêt ;

Chapitre 3 : Méthodes de transfert d'ADN ;

Chapitre 4 : Les stratégies pour la modification de l'expression génique ;

Chapitre 5 : Plantes modèles aux plantes d'intérêt agronomique ;

Chapitre 6 : OGM d'aujourd'hui et de demain : aspect éthiques et économique.

Chapitre 7 : Introduction à l'édition du génome /CRISPR/Cas

Public cible

Ce cours est destiné aux étudiants de 5^{ème} année master 2 spécialité Biotechnologie Végétale.

- Coefficient : 02
- Crédits : 03
- Volume horaire global : 15 heures
- Volume horaire de travail requis/semaine : 1,5h/ semaine
- **Modalité d'évaluation :**
- Examen final : un examen à la fin du semestre.
- TD : Analyse d'article scientifique (exposé)

Objectif du module

L'objectif de ce module est de disséquer l'outil OGM en spécifiant ses composantes, les procédés d'obtention des OGM aux niveaux moléculaires et cellulaires chez les plantes.

Prérequis

Connaissance de base en génétique en biologie moléculaire, biologie végétale et culture *in vitro*.

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un gène.....	3
Figure 2. Étape d'amplification de l'ADN par PCR.....	7
Figure 3. Carte de restriction Cosmide.....	11
Figure 4. Carte de restriction d'un chromosome artificiel.....	12
Figure 5. Carte de restriction d'un vecteur navette.....	12
Figure 6. Principe du clonage moléculaire.....	14
Figure 7. Clonage d'un gène dans le plasmide pBR322.....	15
Figure 8. Les étapes relatives de la création des banques.....	16
Figure 9. Technique de marquage interne.....	20
Figure 10. Criblage d'une banque ADN par hybridation moléculaire avec une sonde ADN radiomarquée.....	22
Figure 11. Autres représentation de la synthénie.....	24
Figure 12. Détermination de l'ordre des clones (séquençage de courtes régions des clones) pour former des contigs.....	27
Figure 13. Transfert par capillarité des fragments d'ADNs séparés sur une membrane poreuse souple (feuille de nylon).....	29
Figure 14. Technique d'hybridation moléculaire par Southern blot.....	30
Figure 15. La génétique directe et reverse en recherche.....	32
Figure 16. Principales étapes de recherche en génétique directe.....	35
Figure 17. Protéines RecA dans la recombinaison homologue.....	38
Figure 18. Principe de la transformation. L'ADN issu d'un organisme étranger ou de l'organisme étudié est modifié puis introduit par technique de transformation.....	43
Figure 19. Schémas du prototype du plasmide Ti.....	45
Figure 20. Mécanisme d'infection par ADNT d' <i>A. tumefaciens</i>	46
Figure 21. La transformation par biolistique.....	47
Figure 22. La transformation par choc thermique.....	48
Figure 23. Principe de l'électroporation.....	49
Figure 24. Transformation chimique de levure par lithium acétate.....	50
Figure 25. La régulation génétique.....	55
Figure 26. La structure d'un opéron simple.....	56

Figure 27. Fonctionnement d'un opéron d' <i>Escherichia coli</i>	58
Figure 28. Opéron lac Z en présence de lactose et absence de lactose.....	59
Figure 29. Opéron lac Z en présence de glucose et de lactose.....	60
Figure 30. La GFP (Green Fluorescent Protein).....	61
Figure 31. Le gène Gus.....	62
Figure 32. Principe de crible bleu-blanc.....	63
Figure 33. Surexpression d'un gène avec un promoteur fort.....	64
Figure 34. Surexpression d'un gène avec un gène rapporteur.....	64
Figure 35. Systèmes inductibles d'expression de gènes.....	65
Figure 36. Décoloration des fleurs de pétunia.....	66
Figure 37. Principe du RNA silencing.....	67
Figure 38. <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
Figure 39. Les lignées <i>japonica</i> (Nipponbare) et <i>indica</i>	71
Figure 40. Cycle de développement du riz.....	73
Figure 41. Génomique comparative riz-céréales.....	74
Figure 42. Différents formes de <i>Lycopersicon</i>	76
Figure 43. Description de <i>Lycopersicon</i>	77
Figure 44. Cycle de développement de <i>Lycopersicon</i>	77
Figure 45. Le peuplier (<i>Populus trichocarpa</i>).....	80
Figure 46. Au cours de la RdDM, les ARN double brin (dsRNA) sont transformés en petits ARN interférants (siRNA).....	93
Figure 47. Agro-infiltration « sensu stricto »	94
Figure 48. Nucléase à doigt de zinc (ZFN).....	95
Figure 49. Schéma d'un locus CRISPR.....	97
Figure 50. Organisation des systèmes CRISPR/Cas de type II.....	100
Figure 51. Fonctionnement du système CRISPR/Cas chez la bactérie.....	101
Figure 52. Biologie du système CRISPR-Cas de type II.....	102
Figure 53. Modifications des profils de maturation de la tomate.....	105
Figure 54. SDN2 sur le promoteur de gène responsable de rendement en cas de stress hydrique chez le maïs.....	105

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux vecteurs et leurs caractéristiques.....	9
Tableau 2 : Exemples de mutations artificielles utilisées en amélioration des plantes.....	39
Tableau 3. Classification d' <i>Oryza sativa</i>	72
Tableau 4. Classification de la tomate	76
Tableau 5. Classification de la luzerne tronquée.....	79

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNg : AND génomique

ADNc : AND complémentaire

ADNase : Enzyme qui dégrade l'ADN

ADNT : ADN d'*A tumefascience*

ARNase : Enzyme qui dégrade l'ARN

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique message

ARNt : Acide Ribonucléique transfert

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

EMS : Ethyle Méthyl Sulfonate

IRRI : International Rice Research Institute

KO : Knuck Out

LacZ : gène qui code la β -galactosidase

miRNA : micro Acide Ribonucléique

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

ORF : Open Reding Frame ; Séquence Ouverte de lecture

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyéthylène Glycol

RE : Réticulum Endoplasmique

siRNA : petit Acide Ribonucléique interférents

Taq : AND polymerase

Ti : Tumor induced

Vir : Virulence

YAC : Yeast Artificial Chromosome

Table des matières

Fiche technique.....	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	IV
Introduction générale.....	1
Chapitre1 : Introduction	2
Partie 1 : Les outils du génie génétique.....	2
1. Gènes et allèles.....	2
2. Les enzymes de restriction.....	3
2.1. Les différents types d'enzymes.....	3
2.1.1. Les enzymes de type I.....	3
2.1.2. Les enzymes de type II.....	4
2.1.3. Enzymes de type III.....	4
3. Les autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaire.....	4
3.1. La RNase.....	4
3.2. Les ligases (Extraites de bactéries).....	4
3.3. Les Exonucléases.....	5
3.4. Enzymes de modification des extrémités de l'ADN.....	5
3.5. Enzymes de synthèse.....	5
3.5.1. Les ADN polymérases ADN dépendantes.....	5
3.5.2. Les ARN polymérases-ADN dépendantes.....	6
3.5.3. Les ADN polymérase ARN dépendante.....	6
4. L'hybridation en phase liquide.....	6
4.1. Principe.....	6
4.2. Applications de l'hybridation moléculaire en phase liquide.....	7
5. L'hybridation sur support solide.....	7
5.1. Principe.....	7
5.2. Les supports utilisés pour immobiliser les acides nucléiques.....	8
6. L'hybridation <i>in situ</i>	8

7. Les vecteurs.....	8
7.1. Propriétés d'un bon vecteur.....	8
7.2. Principes généraux d'utilisation d'un vecteur.....	9
7.3. L'utilisation d'un plasmide.....	9
7.4. Les différents types de plasmides.....	10
7.4.1. Les plasmide de première génération.....	10
7.4.2. Les plasmides de seconde génération.....	10
7.4.3. Les plasmides de troisième génération.....	10
8. Les vecteurs phagiques.....	10
8.1. Les phage de première génération. : Le phage λ	10
8.2. Les phages de seconde génération.....	10
9. Les cosmides.....	11
10. Les vecteurs d'eucaryotes supérieurs (végétaux).....	11
11. Les chromosomes artificiels.....	12
12. Vecteurs navettes.....	12
Partie 2 : Clonage moléculaire.....	14
1. Le principe du clonage.....	14
2. Les banques d'ADN.....	15
2.1. Les banques d'ADN génomique.....	15
2.1.1. Etablissement de la banque d'ADN.....	16
2.2. Les banques d'ADNc.....	17
2.2.1. Le passage de l'ARN à l'ADN.....	17
3. Les banques d'ADN.....	17
4. Criblage de la banque.....	17
5. Les sondes.....	17
5.1. Hybridation moléculaire de la sonde.....	18
6. Marquage.....	18
6.1. Marquage interne.....	19
6.2. Principe de la technique d'hybridation moléculaire avec une sonde ADN radio marquée aux extrémités 5'P.....	20
Chapitre 2 : Isolement du gène d'intérêt.....	24
1. Identifier et isoler un gène d'intérêt.....	24
1.1. La synténie.....	24

1.2.Attribution d'un gène à un chromosome.....	25
1.2.1. La cartographie génétique.....	25
1.2.2. La cartographie physique.....	26
2. Méthodes d'identification et isolement d'un gène.....	27
2.1. Identification d'un gène par homologie de séquence.....	28
2.2. Isolement et identification du gène d'intérêt par Southern blot.....	29
3. Identification et isolement d'un gène par recherche de variants (mutants).....	31
3.1. Différents types de mutation.....	31
3.2. L'approche de génétique directe et génétique reverse en recherche.....	32
3.3. La mutagenèse aléatoire.....	33
3.3.1. Mutagenèse par agents chimique.....	33
3.3.2. Mutagenèse par agents physique.....	33
3.3.3. Mutagenèse insertionnelle à l'ADNT.....	34
3.4. Le crible de mutants.....	34
3.5. Identification de mutations.....	35
3.5.1. Identification de mutations ponctuelles.....	36
3.5.2. Identification de mutation causée par une insertion.....	36
3.6. Validation de gènes candidat.....	37
3.7. Mutagenèse dirigée.....	37
3.8. Mutagenèse en système bactérien & fongique.....	37
3.9. Utilisation de la mutagenèse en amélioration des plantes.....	38
3.10. Place de la mutagenèse dans l'amélioration des plantes.....	40
3.11. Vers une mutagenèse génique dirigée.....	40
4. Interrogation de banques de données (recherche <i>in silico</i>).....	40
Chapitre 3 : Méthodes de transfert d'ADN.....	43
1. Principe de la transformation.....	43
2. Le passage par la culture <i>in vitro</i>	43
3. Méthodes de transformation.....	44
3.1. Transfert non ciblé d'un gène.....	44
3.2. Transfert direct.....	47
4. Autres techniques de transformation.....	48
4.1. Transformation par choc physique.....	48
4.2. Transformation par choc thermique.....	48

4.3. Transformation par choc électrique.....	49
4.4. Transformation chimique.....	49
4.5. Micro injection.....	50
5. Transfert ciblé d'un gène.....	50
6. Détection des plantes transformées.....	51
7. Site d'insertion et expression du gène.....	52
Chapitre 4 : Stratégie pour la modification de l'expression génique.....	55
1. La régulation génétique.....	55
2. Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription.....	55
3. Exemple d'un opéron inducteur.....	56
3.1. Organisation de l'opéron lactose.....	56
3.2. Fonctionnement d'un opéron d' <i>Escherichia coli</i>	57
3.2.1. En présence de glucose et absence de lactose.....	57
3.2.2. En présence de lactose et absence de lactose.....	59
3.2.3. En présence de glucose et de lactose.....	59
4. Visualisation de l'expression des transgènes.....	60
4.1. Le promoteur.....	60
4.2. Gène rapporteur.....	61
4.2.1. Gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein) de la méduse.....	61
4.2.2. Le gène Gus.....	62
4.2.3. Le gène lac Z.....	62
5. Stratégie de modification génique.....	63
5.1. Surexpression d'un gène avec un gène rapporteur.....	64
5.2. Systèmes inductibles d'expression de gènes.....	64
6. Inactivation de gènes par ARN antisens.....	65
6.1. Découverte de l'ARN interférence.....	65
6.2. Invalidation de gènes par approche RNA silencing.....	67
Chapitre 5 : Des plantes modèles aux plantes d'intérêt agronomique.....	69
1. Une plante modèle.....	69
2. Pourquoi des plantes modèles ?.....	69
3. Les plantes modèles.....	69
3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
3.2. <i>Oryza sativa</i>	71

3.2.1. Origine et taxonomie du riz.....	71
3.2.2. Classification.....	72
3.2.3. Cycle de développment.....	73
3.2.4. Outils disponibles.....	73
3.2.5. Utilisation comme modèle.....	73
3.2.6. Génomique comparative riz-céréales.....	74
3.3. <i>Solanum lycopersicum</i>	75
3.3.1. Classification.....	76
3.3.2. Caractéristiques visibles.....	76
3.3.3. Origine et production.....	76
3.3.4. Description de la plante.....	77
3.3.5. Utilisation comme modèle.....	78
3.3.6. Outils disponibles.....	78
3.4. <i>Medicago truncatula</i>	78
3.4.1. Classification taxonomique.....	79
3.4.2. Origine et production.....	79
3.4.3. Intérêt agronomique.....	79
3.4.4. Description de la plante.....	79
3.4.5. Outils disponibles.....	79
3.4.6. Utilisation comme modèle.....	79
3.5. Le peuplier.....	80
3.5.1. Le peuplier comme modèle.....	81
Chapitre 6 : OGM d’aujourd’hui et de demain.....	83
1. Introduction.....	83
2. OGM et transgénèse.....	83
3. La transgénèse en amélioration des plantes.....	84
3.1. L'apport et la place de la transgénèse.....	84
4. Application agronomiques des OGM.....	85
5. Impact des OGM.....	86
5.1. Impacts sur la santé.....	86
5.2. Impacts sur l’environnement.....	87
6. Aspects socio-économiques.....	87
7. La perception sociale des OGM	88

8. Aspects éthiques ou morales.....	89
9. Débat scientifique (Atelier).....	89
Chapitre 7 : Introduction à l'édition du génome /CRISPER/Cas	92
1. Introduction.....	92
2. De nouvelles techniques d'amélioration végétale.....	92
2.1. La cisgénèse et l'intragenèse.....	92
2.2. Mutagenèse dirigée par oligonucléotide.....	92
2.3. Méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN.....	93
2.4. Agro-infiltration.....	94
2.5. Sélection inverse.....	95
2.6. Le greffage sur des porte-greffes génétiquement modifiés.....	95
8. Les nucléase ciblées.....	95
8.1 Nucléase à doigt de zinc (ZFN).....	95
8.2. Les méganucléases.....	96
8.3. Les TALENs.....	96
8.4. CRISPR.....	96
➤ L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome.....	97
1. Découverte de CRISPR.....	97
2. Découverte des gènes Cas.....	99
2.1. Découverte du SgRNA.....	99
3. Description du système CRISPR/Cas de type II.....	100
4. Principe de la technique CRISPR-Cas9.....	100
6. Applications de la technologie CRISPR-Cas9	102
6.1. Place de CRISPR-Cas9 dans l'amélioration des plantes	102
6.2. Orientations prospectives des systèmes de ciblage d'ARN CRISPR/Cas13 dans les plantes.....	103
Travaux dirigés	108
Analyse d'articles scientifiques.....	108

Introduction générale

Ce cours aborde une science assez importante pour le développement durable dans le domaine de l'agriculture, c'est l'Amélioration des plantes par le génie génétique. Les travaux de biologie moléculaire se sont beaucoup développés à partir de 1950, avec les études sur l'ADN ont conduit à deux types d'outils, apparus dans les années quatre-vingts : le marquage moléculaire du génome et la transgénèse. Le marquage moléculaire dense du génome a ouvert la voie à une véritable construction de génotypes. Quant à la transgénèse, elle permet un transfert très rapide d'un gène d'une espèce dans le génome d'une autre espèce ce qui apporte une variabilité génétique nouvelle. La mutagenèse apporte des caractères nouveaux en modifiant les gènes déjà présents dans un génotype. On remarque qu'il y a eu évolution considérable de ces outils permettant au sélectionneur de mieux apprécier la variation génétique et de mieux l'utiliser dans un intervalle de temps plus court (Gallais, 2013).

En effet, on constate que l'amélioration des plantes est en continuel évolution grâce au développement des techniques récentes de biologie moléculaire, du génie génétique, de la génomique et de la bio-informatique, qui ont contribué efficacement et d'une façon rapide pour créer des variétés végétales nouvelles et pour les besoins d'agriculture durable en se basant sur la grande diversité végétale existante dans le monde (Vizzini *et al*, 2017).

Dans ce contexte, le présent document a pour objectif de disséquer l'outil OGM en spécifiant ses composantes, les procédés d'obtention des OGM aux niveaux moléculaires et cellulaires chez les plantes.

- Ce cours renforce les connaissances acquises sur la structure moléculaire de l'ADN et des éléments de base ;
- Consolider les acquis des techniques et méthodes de génie génétique de transfert des gènes et de la transformation des plantes ;
- Initiation aux méthodologies d'obtention des OGM pour une amélioration variétale ;
- Un TD est proposé afin de comprendre comment analyser des articles scientifiques.



Chapitre 1 :

- ✓ Outils de génie génétique
- ✓ Clonage moléculaire

Partie 1 : RAPPELS : LES OUTILS DU GENIE GENETIQUE

1. Gènes et allèles

Toute introduction à la génétique se doit d'abord de définir le concept de « gène ». Un gène est une séquence d'ADN qui contient l'information génétique codant pour la synthèse d'ARN (acide ribonucléique). Cet ARN peut ensuite être traduit à une protéine, déterminant une fonction ou un caractère, mais ce n'est pas toujours le cas. On distingue 2 types de gènes : **gènes de structure**, qui codent pour des protéines, et **les gènes de régulation**, qui contrôlent l'expression des gènes de structures via des protéines ou des ARN (Figure 1). Cependant, des gènes de structure peuvent aussi être des gènes de régulation. Chaque gène occupe une position précise, ou **locus**, sur un chromosome.

Le contrôle de l'expression d'un gène codant ou pas des protéines dépend de séquences régulatrices situées soit à proximité, voir dans la région transcrite appelés promoteurs, ou bien distantes, pouvant stimuler (en anglais : enhancers) ou inhiber (silencers) l'expression génique. Actuellement, le concept du gène tend à comprendre la région qui serait transcrite mais aussi les éléments de régulation (comme promoteurs) et les séquences requises pour la terminaison de la transcription. Chez certains virus, le matériel génétique se présente sous forme d'ARN. Dans ces cas, il n'y a pas d'étape de transcription et les gènes sont directement les segments d'ARN codant les protéines virales (ou des ARNs non codant fonctionnels).

L'ensemble des gènes d'un organisme, ainsi que le reste du matériel génétique constituent son génome. Le génome peut se composer d'un ou de plusieurs chromosomes. Les organismes haploïdes contiennent un seul exemplaire de chaque chromosome (n), les diploïdes en possèdent deux ($2n$) et les polyploïdes plusieurs ($>2n$).

Pour une espèce donnée, tous les individus ont les mêmes gènes, c'est-à-dire le même ensemble de fonctions, mais pour un gène donné, l'information génétique peut varier de plus en moins d'un individu à l'autre. Ainsi, au sein d'une espèce où le caractère “couleurs de fleurs” (blanche ou rouge) serait contrôlé par un seul gène, selon les plantes considérées c'est l'information “couleur blanche” ou au contraire, l'information “couleur rouge” qui sera présente. Ces variantes de l'information pour une fonction donnée, un locus donné, sont appelées des **allèles**. Si dans un ensemble de génotypes étudiés (population) il y a à un locus plusieurs allèles, on dit qu'il est polymorphe. C'est la diversité des allèles qui est à la base de la variabilité génétique utilisée en sélection.

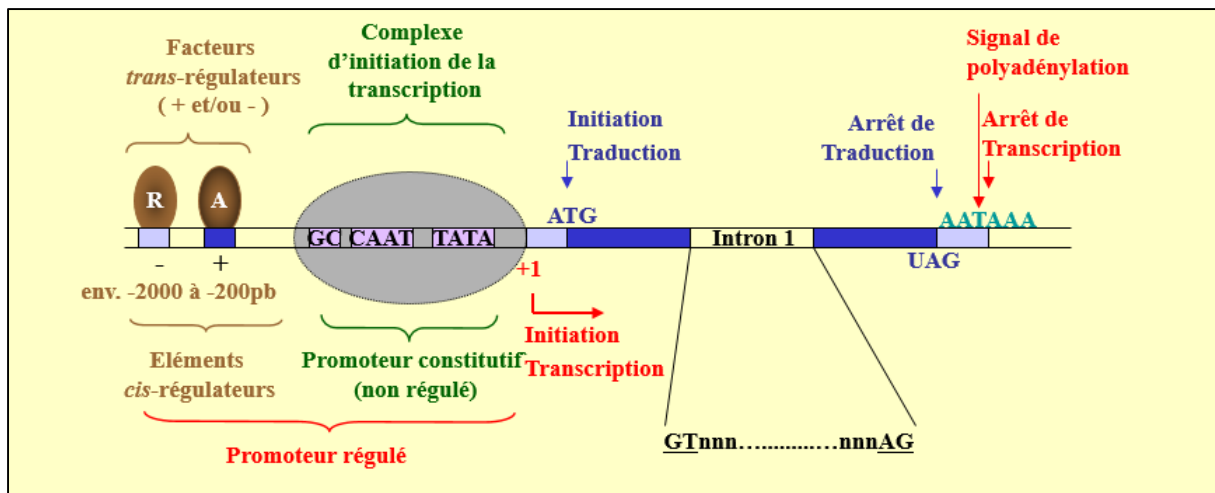


Figure 1 : structure d'un gène

2. Les enzymes de restriction

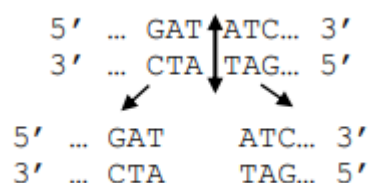
Les enzymes de restriction ont été identifiées au début des années 50 chez les bactéries. Elles sont des protéines ayant une activité enzymatique caractérisée par une capacité de couper l'ADN double brin, donc elles font partie de la grande famille des endonucléases. Ces enzymes permettent de dégrader l'ADN étranger pénétrant au sein des cellules bactériennes incluant ceux des phages.

2.1. Le mécanisme de restriction

Le mécanisme de restriction est une réaction chimique qui aboutit au clivage d'une séquence ADN double brin de manière spécifique. Cette réaction est médiée par les enzymes de restrictions. Il existe dans la nature un nombre important d'enzymes isolées à partir des bactéries, chaque enzyme reconnaît une séquence spécifique de 4 à 8 paires de bases qui forment un palindrome, c'est-à-dire ayant la même séquence sur les deux brins, mais en direction opposée.

2.2. Types de coupures

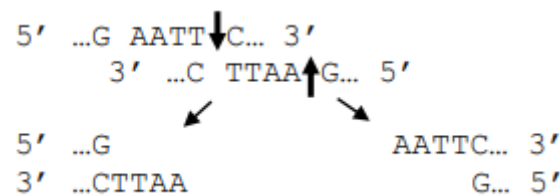
- **Coupure à bouts francs** : coupure au milieu du site de restriction 2 fragments à extrémités franches. **Exemple** : site de restriction de **EcoRV**



La coupure de l'ADN peut aboutir à la libération de bouts francs ou de bouts cohésifs, ces derniers à l'inverse des bouts francs sont complémentaires et peuvent se ré-hybrider (reformer un double brin).

- Coupure à bouts cohésifs (ou collants) : coupure de part et d'autre du centre de symétrie du site de restriction 2 fragments à extrémités cohésives (elles vont permettre à toutes les extrémités complémentaires créées par la même enzyme de restriction de venir s'apparier par des liaisons hydrogènes grâce à une enzyme dite ligase).

Exemple : site de restriction de EcoRI



2.3. Nomenclature des enzymes de restriction

Dans la nature on peut identifier trois grandes classes d'enzyme de restriction, les enzymes de classe/type I, II et III.

Le type I reconnaît une séquence d'ADN, puis se déplace, s'arrête 1000 à 5000 paires de bases plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides. Le type II, coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue. Le type III coupe une vingtaine de nucléotides plus loin que le site de reconnaissance.

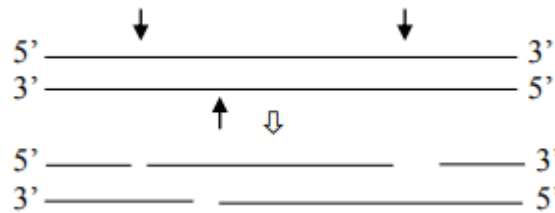
2.4. Les différents types d'enzymes

2.4.1. Les enzymes de type I

Sont des hétéro multimères dont la caractéristique principale réside dans le fait que la séquence reconnue et celle qui subit la réaction de clivage sont séparées. Ainsi l'enzyme après reconnaissance clive de manière non-spécifique une séquence d'ADN située de 100 à 1000 pb en aval du site de reconnaissance.

Exemple : **DNAse I = endonucléase** (extraite du pancréas de bovins). Toutes les DNases ont besoin d'ions divalents. Pour les inhiber, on peut donc utiliser un chélateur d'ion divalent tel que l'EDTA. Une solution d'ADN comportant de l'EDTA sera donc stable). On distingue les

exonucléases qui digèrent l'ADN en retirant les nucléotides à partir de l'extrémité et les endonucléases qui coupent au milieu de l'ADN.



- **Nucléase S1** : (extraite d'un champignon) n'attaque que l'ADN simple brin

2.4.2. Enzymes de type II

Les enzymes de type II sont des monomères ou homo multimères. A l'inverse des enzymes de type I, celle de type II réalisent la reconnaissance et le clivage sur la même séquence, de ce fait le clivage devient site spécifique. Ce type d'enzyme est celui le plus employé en génie génétique, notamment pour le clonage moléculaire.

2.4.3. Enzymes de type III

De manière similaire aux enzymes de classe I, le type III se présente sous forme d'un complexe hétéro multimérique dont la séquence de reconnaissance et celle de clivage sont séparées physiquement. A l'inverse de la classe I, les enzymes de classe II clivent une séquence moins éloignée de la séquence de reconnaissance (25 à 27 pb en aval de la séquence de reconnaissance).

3. Les autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaire

En génie génétique il existe en plus des enzymes de restrictions utilisées traditionnellement pour le clonage moléculaire, d'autres familles d'enzymes utilisées dans différentes expérimentations.

3.1. La RNase

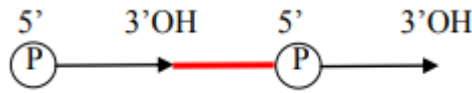
Exemples : **RNase A** très spécifique et thermostable qui hydrolyse l'ARN simple brins après les pyrimidines et la **RNase H** qui hydrolyse l'ARN dans les hybrides ARN/ADN.

3.2. Les ligases (Extraites de bactéries)

Assurent la soudure entre 2 fragments d'ADN par établissement de liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH libre et une extrémité 5'P libre en présence d'ATP. Elles peuvent

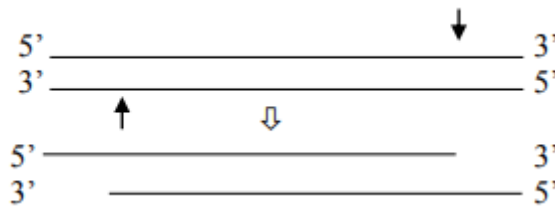
effectuer des ligatures sur des fragments d'ADN à bouts francs ou à bouts cohésifs, la ligase utilisée dépend donc des extrémités de l'ADN. Ainsi :

- **La ligase E. coli** : ne peut lier que 2 fragments d'ADN à extrémité cohésives, alors que
- **La ligase T4 = T4 DNA ligase** : est capable d'assurer la ligature des 2 types d'extrémités.



3.3. Les Exonucléases

Coupent les nucléotides un par un à partir d'une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l'extrémité 5' (coupure $5' \rightarrow 3'$), soit de l'extrémité 3' (coupure $3' \rightarrow 5'$). L'exonucléase III par exemple catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides de l'ADN à partir de l'extrémité 3'OH libre \rightarrow obtention de l'ADN simple brin. Elle possède en plus une activité 3' phosphatase.



3.4. Enzymes de modification des extrémités de l'ADN

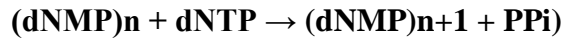
- **Les phosphatases** = enzymes de déphosphorylation (extraites des bactéries ou des animaux) Utilisées pour préparer de l'ADN recombinant. Exemple : la phosphatase alcaline (active à pH alcalin) qui retire le groupement phosphate en 5' sur l'ADN et l'ARN. Cette enzyme est surtout utilisée pour déphosphoryler un vecteur qu'on vient d'ouvrir pour éviter sa reformation.

- **Les kinases** = enzymes ajoutant des groupements phosphates (extraites des bactéries) Permettent de fixer un groupement phosphate en présence d'ATP tel que **la T4 polynucléotide kinase = T4 PK** qui permet le transfert d'un groupement phosphate en position gamma à partir d'une molécule d'ATP sur l'hydroxyle 5' d'un ADN préalablement déphosphorylé.

3.5. Enzymes de synthèse

Recopient une chaîne d'ADN ou d'ARN dans le sens **5'---- 3'** de manière **complémentaire et antiparallèle** en présence de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs) ou de nucléosides triphosphates (NTPs), respectivement.

3.5.1. Les ADN polymérases ADN dépendantes : synthétisent le nouveau brin d'ADN en présence d'une amorce d'acide nucléique avec une extrémité 3' OH libre. Ces ADN pol catalysent la réaction de polymérisation générale suivante dans le sens 5' ---- 3' :



Avec N = A, C, T ou G. PPi = groupe pyrophosphate

Exemples :

- **ADN pol I E.coli** (extraite d'E. coli), impliqué dans la réparation. Ainsi, en plus de son activité polymérase 5' → 3', elle possède 2 activités exonucléases (3' → 5' et 5' → 3'). A partir de l'ADN pol I, une enzyme appelée **fragment ou enzyme de Klenow** est préparée, qui n'a qu'une activité polymérase (5' → 3') et une activité exonucléase 3' → 5'. Ce dernier permet aux enzymes de vérifier que les appariements de bases qui viennent d'être ajoutés respectent les règles de complémentarité lors de la synthèse des fragments d'ADN.
- **Taq polymérase** : est une ADN polymérase thermostable isolée à partir de *Thermus aquaticus* vivant dans des sources chaudes. L'enzyme a un poids moléculaire de 95 kDa et présente à la fois une activité d'ADN polymérase 5'→3' et une activité exonucléase 5'→3. Utilisée dans les réactions d'amplification in vitro de l'ADN par PCR et dans les réactions de séquençage de l'ADN.

3.5.2. Les ARN polymérases-ADN dépendantes : (extraites des bactéries), ce sont des enzymes classiques qui transcrivent l'un des deux brins d'ADN en un seul ARN. Ils n'ont pas besoin d'amorces et ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN a un promoteur spécifique pour chacun d'eux. Ils nécessitent des ions NTP et Mg²⁺. Ils n'ont pas d'activité exonucléase 3' → 5'. Ils sont utiles pour la synthèse en masse d'ARN à utiliser comme sondes (ribosondes) et pour étudier la structure de l'ARN et ses interactions avec l'ADN et les protéines.

Exemples : Les 3 ARN pol les plus utilisées en génie génétique et en biologie moléculaire : Sp6 ARN pol (*Salmonella Thyphimurium*), T7 ARN pol (extraite des bactéries *E. coli* infectées par le phage T7) et T3 ARN pol (extraite des bactéries *E. coli* infectées par le phage T3).

3.5.3. Les ADN polymerase ARN dépendante

La Transcriptase reverse ou rétrotranscriptase par exemple présente principalement dans les rétrovirus (virus à ARN) (codés par le gène pol), dont la multiplication nécessite le passage d'ADN.

Elle représente la base des techniques de biologie moléculaire puisqu'elle permet la transcription reverse de l'ARNm en ADN complémentaire. Elle nécessite une extrémité 3' OH et d'une amorce pour fixer les dNTP. Elle n'a pas d'activité exonucléasique 3' → 5' et a une activité RNase.

4. Rappel sur le principe de la réaction d'hybridation

L'hybridation est une réaction qui a lieu entre deux molécules d'acides nucléiques complémentaires, elle consiste à l'établissement de ponts hydrogènes entre les deux molécules, permettant la formation d'une molécule bicaténaire.

4.1. Notion de température de fusion de l'ADN

La température de fusion est définie comme la température à laquelle la moitié d'une molécule d'ADN bicaténaire se sépare. Cette température varie d'une molécule à une autre, ainsi que d'une condition à une autre. Elle est utilisée afin d'apprécier la température à laquelle deux molécule d'ADN/ARN s'hybrident.

4.2. Facteurs influençant la température de fusion

Plusieurs paramètres peuvent influencer la température de fusion notamment la nature du milieu chimique au sein duquel a lieu la réaction et le nombre de mésappariements entre les bases.

Le nombre de pont hydrogène au sein d'une molécule influence la température de fusion ainsi plus le nombre de liaison est élevé et plus la température de fusion doit être importante. Deux paramètres principaux influencent le nombre de ponts hydrogènes, le premier est la longueur de la molécule et le second est la composition relative en Guanine/Cytosine.

5. L'hybridation en phase liquide

5.1. Principe

L'hybridation en phase liquide consiste à réaliser la réaction d'hybridation au sein d'un milieu contenant un tampon et du formamide. Sous l'agitation thermique les deux molécules se rapprochent l'une sur l'autre à température inférieure à celle de la température de fusion.

5.2. Applications de l'hybridation moléculaire en phase liquide

Il existe un nombre important d'applications liées à l'hybridation moléculaire en phase liquide, l'une des plus importantes est l'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique s'appuie sur l'utilisation d'un couple d'oligonucléotides de tailles variant entre

16 à 32 nucléotides qui s'hybrident de manière spécifique de part et d'autre de la séquence d'ADN à amplifier.

La réaction a lieu dans un tampon en présence d'oligonucléotides triphosphates, de $MgCl_2$ + et nécessite l'action d'une ADN polymérase thermorésistante telle que la Taq. Après dénaturation de l'ADN à 94°C, une hybridation des amorces est réalisée en abaissant la température de 54 à 64 °C, enfin à 72°C l'enzyme se fixe sur l'amorce hybridée et procède à la néosynthèse du fragment d'ADN en intégrant les nucléotides complémentaires à la matrix. La procédure est répétée plusieurs fois (ou plusieurs cycles) afin d'augmenter la quantité du fragment ciblé (Figure 2).

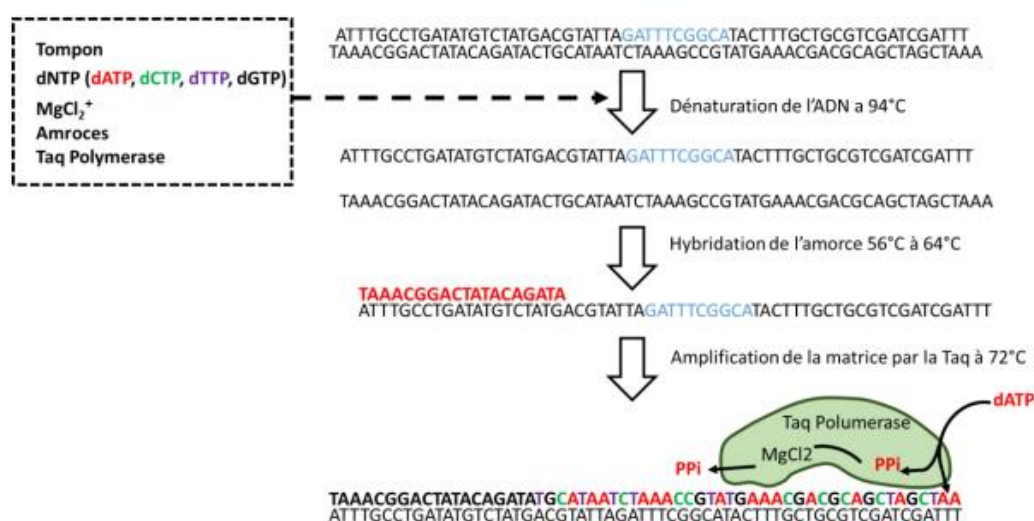


Figure 2. Étape d'amplification de l'ADN par PCR. Dans un tampon contenant des dNTP, du $MgCl_2$ + , des amorces et la taq, l'ADN est ajouté. Une dénaturation à 94°C est réalisée, puis les amorces s'hybrident à une température variant de 56 à 64°C en fonction de leurs compositions en G/C et de leurs longueurs. A 72°C la Taq procède à l'intégration des nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN. Chaque nucléotide triphosphate est hydrolysé et le pyrophosphate généré (PPi) est évacué par le $MgCl_2$ +.

6. L'hybridation sur support solide

6.1. Principe

L'hybridation des fragments d'ADNs cibles a lieu sur un support solide sur lequel est placé l'ADN appât complémentaire, l'ADN cible est apporté sous forme liquide. Cette approche permet un lavage des ADNs qui ne s'hybrident pas.

6.2. Les supports utilisés pour immobiliser les acides nucléiques

Plusieurs types de supports peuvent être utilisés, la nitrocellulose à 80°C permet la création de liaisons irréversibles avec les acides nucléiques à de hautes concentrations ioniques. Les membranes synthétiques telles que le nylon peuvent être aussi utilisées. Ce type de support après activation au rayon ultraviolet crée des associations plus stables avec les acides nucléiques que celles établies avec la nitrocellulose. Pour certaine technique telle que l'analyse d'expression de gènes par puce à ADN, une lame de verre est utilisée comme support d'immobilisation.

7. L'hybridation *in situ*

C'est une technique qui est employée pour la réalisation d'hybridation d'acides nucléiques sur des tissus fixés. Elle consiste en l'utilisation de sondes d'ADN marquées qui sont appliquées sur des coupes d'organe ou des cellules, les sondes ciblent les ARNm de gènes dont l'expression doit être localisée au sein de l'organe. Elles peuvent aussi cibler des séquences d'ADN dans le cas du FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) afin de localiser un gène au sein du génome. Après hybridation, une étape de lavage à lieu dans le but de retirer le surplus de sondes, puis une révélation est réalisée afin de mettre en évidence les zones au sein desquelles les sondes se sont hybridées. Le marquage des sondes peut être réalisé à chaud dans le cas d'un marquage avec un isotope radioactif tel que le phosphate radio marqué (P32) ou un marquage à froid qui consiste à l'ajout d'une molécule non-radioactive sur la sonde.

8. Les vecteurs

Un vecteur est un système permettant le transfert, l'expression et la réplication d'un ADN étranger dans les cellules hôtes en vue d'un clonage moléculaire. Couramment utilisés en vue de production de protéine recombinante, pour le séquençage d'un gène, ou pour la sélection d'un gène dans une banque d'ADN.

8.1. Propriétés d'un bon vecteur

- Réplication active et autonome dans la cellule hôte.
- Présence de marqueurs de sélection.
- Présence d'un grand nombre de sites polylinkers localisés dans les gènes de sélection.
- Sa présence ne doit pas perturber la physiologie de cellule hôte et vice versa.
- Facile à isoler sous forme purifiée.

8.2. Principes généraux d'utilisation d'un vecteur

Les principaux vecteurs de clonages sont les plasmides bactériens, les vecteurs phagiques (qui sont des virus infectant les bactéries) ainsi que les chromosomes artificiels de levure et de bactérie, YAC et BAC respectivement. Le choix du vecteur dépend du type d'approche choisie lors de l'étude, un vecteur plasmidique sera préférentiellement utilisé pour le séquençage de petit fragments d'ADN (jusqu'à 2 kilo bases), alors que des vecteurs phagiques, YAC (Yeast Artificial Chromosome) ou BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sont utilisés pour réaliser des banques d'ADN génomiques (voir tableau 1).

Tableau 1. Principaux vecteurs et leurs caractéristiques

Vecteur	Taille de l'insert	Exemple	Caractéristiques
Plasmide	<20 kb	puc19	Se réplique indépendamment du chromosome, plusieurs copies peuvent être contenues dans une cellule, division cellulaire rapide
Bactériophage	9-25 kb	λ1059	Empaqueté dans un phage modifié afin de générer des doubles ou simples brin d'ADN au sein de l'hôte
Cosmide	30-47 kb	pJC720	Peut-être empaqueté dans un phage et répliqué dans une bactérie comme un plasmide
BAC	75-300 kb	pBAC108L	F plasmide modifié, très stable dans une cellule
YAC	100-1,000 kb	pYAC	Replicable dans <i>S. cerevisiae</i>

8.3. L'utilisation d'un plasmide

Le plasmide est un matériel génétique extrachromosomique sous forme d'une molécule d'ADN circulaire de 3 à 10 kb, capable de se répliquer dans une bactérie. Naturellement il contient des gènes impliqués dans l'adaptation des bactéries à l'environnement telle que les gènes de pathogénicité. En génie génétique, le plasmide a été modifié pour devenir un plasmide

générique, ce dernier est utilisé comme vecteur d'inserts dont la taille est inférieure à 20kb. Un vecteur plasmidique générique contient une origine de réplication qui permet à l'ADN de se répliquer. Un site de multicolonnage au sein duquel l'insert est introduit et un gène de résistance à un antibiotique qui permet de sélectionner les bactéries ayant intégrées le vecteur.

8.4. Les différents types de plasmides

8.4.1. Les plasmide de première génération

Ce sont les premiers plasmides utilisés, ils sont à l'état naturel et non-modifiés tel que les plasmides ColE1, RSF2124 et pSC 101.

8.4.2. Les plasmides de seconde génération

Ce sont des plasmides dérivés de ceux de premier génération, mais ayant subis des modifications afin de les améliorer, notamment par :

- i. L'ajout de gène de résistance à différents antibiotiques, ceci afin d'améliorer le processus de sélection des clones.
- ii. Par l'ajout d'un site de multicolonnage possédant des sites de restrictions pour plusieurs enzymes dans le but de faciliter l'intégration de l'insert.

8.4.3. Les plasmides de troisième génération

Ce sont des plasmides de deuxième générations améliorés pour éviter le passage par une phase de sous clonage, l'insert peut directement être intégré dans le plasmide d'intérêt.

9. Les vecteurs phagiques

9.1. Les phage de première génération. : Le phage λ

Le phage λ est un bacériophage capable d'infecter la bactérie *Escherichia coli*. De cycle tempéré il peut réaliser en fonction des conditions un cycle lytique aboutissant à la production de milliers de copies du virus et à la mort de la bactérie, ou un cycle lysogène au cours duquel il intègre le génome bactérien sans provoquer la mort. Possédant un ADN double brin de 48502 pb de forme linéaire, il se circularise au sein de la bactérie. Le génome du phage est composé des gènes nécessaires à son maintien et à sa réplication au sein d'une cellule hôte. Les séquences d'ADN à insérées de taille allant de 40 à 50 kb peuvent être introduites entre les séquences Cos. Le phage λ est largement utilisé en génie génétique notamment pour la création de banque d'ADN.

9.2. Les phages de seconde génération

Les phages de seconde génération sont des virus dérivés de phage naturel tel que le phage λ . Ils sont modifiés afin d'améliorer les propriétés du phage, par exemple dans le cas du phage Embl 3 & 4 des sites de restriction sont introduits entre les séquences Cos afin de permettre un clonage directionnel de l'insert.

10. Les cosmides

Un cosmide (Figure 3) est un vecteur contenant en plus du site de multicolonnage, des gènes lui permettant d'être multiplié dans une bactérie (origine de réplication, gène de sélection), à cela s'ajoute les gènes Cos permettant l'encapsidation dans un phage λ . Le cosmide est encapsidé dans le phage, puis après infection de la bactérie par le virus, le vecteur se multiplie tel un plasmide.

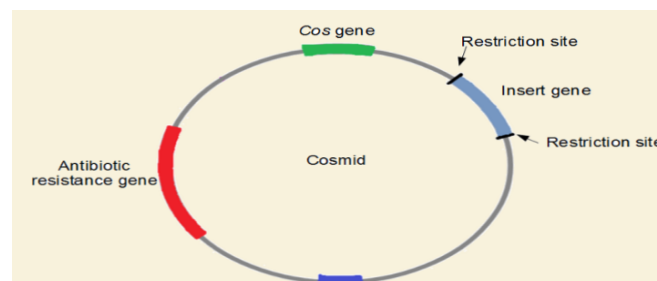


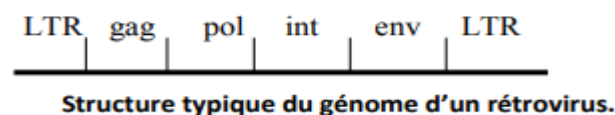
Figure 3. Carte de restriction Cosmide

11. Les vecteurs d'eucaryotes supérieurs (végétaux)

Les vecteurs de transfert d'ADN dans les cellules eucaryotes sont d'utilisation plus complexe et chaque vecteur est spécifique d'une espèce eucaryote.

Exemples : rétrovirus et le plasmide Ti = pTi (= plasmid tumor inducing) de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

► **Les rétrovirus** : Le virus à ARN pénètre dans les cellules eucaryotes et convertit le génome en ADN (rétrotranscription), permettant au génome de s'intégrer dans le génome de l'hôte (grâce à l'intégrase virale). Les gènes "gag", "pol" et "env" du virus peuvent être retirés et remplacés par l'ADN à cloner. Cet ADN est intégré dans des cellules hôtes eucaryotes.



L'ARN du rétrovirus comporte à chaque extrémité de longues séquences répétées terminales **LTR** (long terminal repeat). La partie centrale contient une séquence **gag** qui code pour une **glycoprotéine de structure**, une séquence **pol** codant la transcriptase inverse, une séquence **int**

responsable de la biosynthèse de l'intégrase qui intervient dans l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire et une séquence **env** qui code une **protéine de l'enveloppe virale**.

12. Les chromosomes artificiels

Ce sont des minichromosomes qui copient les chromosomes de la cellule hôte eucaryote et se répartissent régulièrement lors des divisions, comme les chromosomes naturels. Le plus utilisé est le pYAC (yeast artificial chromosome) (Figure 4) construit à partir des levures et capable d'insérer de grands fragments d'ADN de 140 à 1000 Kb (exemple YAC2 qui fait 11,2 Kb de taille). Il possède une origine de réplication (ORI), une région centromérique (CEN) qui assure la migration correcte du minichromosome, un site unique de clonage (EcoR I) et un ou plusieurs marqueurs de sélection (A et B).

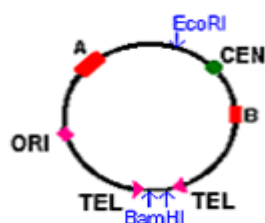


Figure 4. Carte de restriction d'un chromosome artificiel

13. Vecteurs navettes

Les vecteurs navettes sont des vecteurs possédant les gènes nécessaires pouvant leur permettre d'être utilisés dans deux microorganismes différents. Le cosmides est un bon exemple de vecteur navette (Figure 5).

Exemple : Vecteur navette bactérie-levure : possède deux origines de réplication : une reconnue par la machinerie de réplication de *E. coli* (ori) et l'autre reconnue par la machinerie de la levure *S. cerevisiae* (ori 2 μ m). Il possède aussi deux gènes de sélection : l'un est utilisé chez la bactérie (AmpR) et l'autre chez la levure (le marqueur de nutritionnel URA 3; le milieu de sélection correspondant sera un milieu sans uracile). Un seul site de clonage multiple est nécessaire.

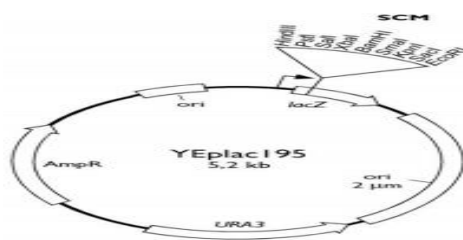


Figure 5. Carte de restriction d'un vecteur navette

Références bibliographiques

- Burrell, Michael M. 1993. *Enzymes of Molecular Biology*. First Edit. Humana Press.
- Dalbey, Ross, Carla Koehler, and Fuyuhiko Tamanoi. 2007. *The Enzymes*. First Edit. Academic Press.
- Gallais, A. 2013. *De la domestication à la transgénèse*. éditions Quea, paris 174 p.
- Johnson, Iain, and Michelle T.Z. Spence. 2010. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. First Edit. Invitrogen.
- Metfies, Katja, and Linda Medlin. 2005. “Ribosomal RNA Probes and Microarrays: Their Potential Use in Assessing Microbial Biodiversity.” In *Methods in Enzymology*, Elsevier, 258–78. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95016-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95016-7).
- Osada, Hiroyuki. 2000. *Bioprobes: Biochemical Tools for Investigating Cell Function*. First Edit. Springer.
- Rittié, Laure, and Bernard Perbal. 2008. “Enzymes Used in Molecular Biology: A Useful Guide.” *J Cell Commun Signal* 2: 25–45.
- Symons, Robert H. 1989. *Nucleic Acid Probes*. CRC Press.
- Vizzini, Priya, Lucilla Iacumin, Giuseppe Comi, and Marisa Manzano. 2017. “Development and Application of DNA Molecular Probes.” *AIMS Bioengineering* 4(1): 113–32.
- Wilson, K. 2010. “Enzymes.” In *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, eds. Keith Wilson and John Editors Walker. Cambridge University Press, 581– 624.

Partie 2 : Clonage moléculaire

1. Le principe du clonage

Le clonage moléculaire consiste à introduire une séquence d'ADN appelée insert dans un vecteur. Le vecteur recombiné (contenant l'insert) est introduit dans un virus ou un microorganisme (bactérie, levure). Le type de vecteur varie en fonction de l'organisme receveur. L'organisme est transformé par la construction moléculaire, après introduction, une phase de sélection est réalisée afin d'isoler les microorganismes transformés (Figure 6).

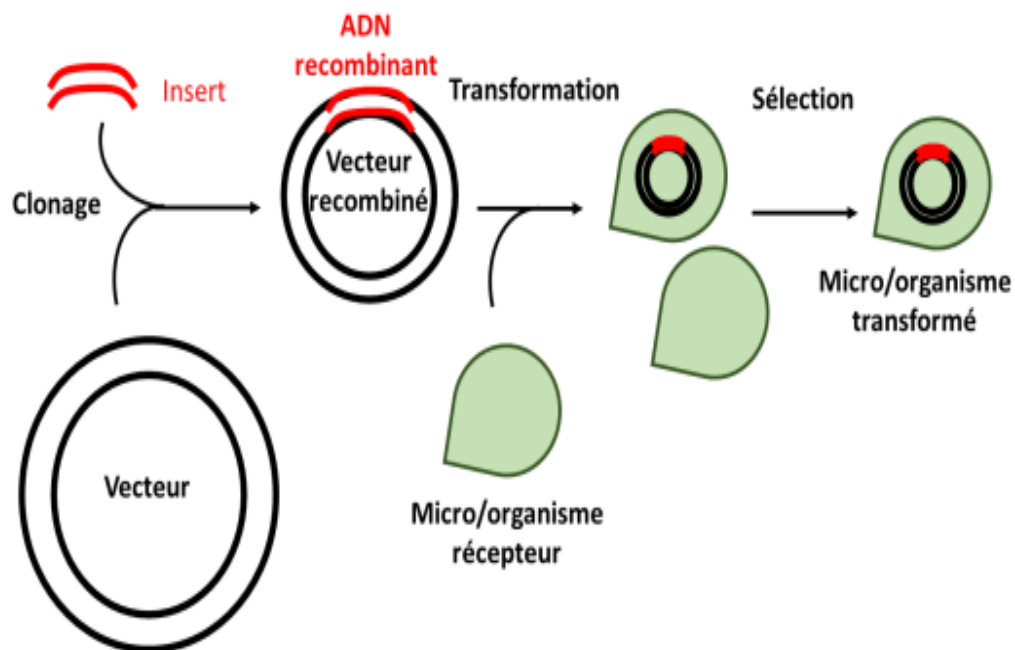
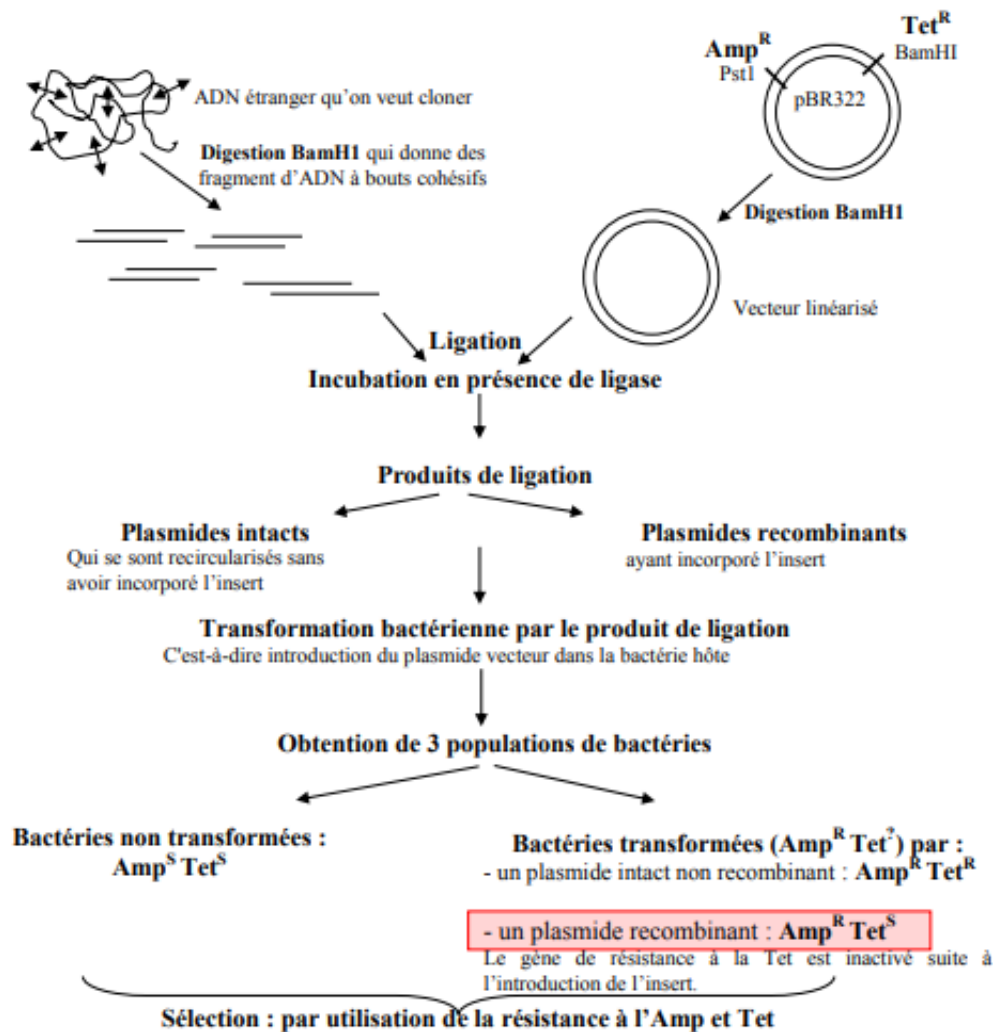


Figure 6. Principe du clonage moléculaire. L'insert (ADN à cloner) est introduit au sein d'un vecteur. Après intégration le vecteur est dit recombiné et il est introduit par transformation dans un microorganismes/virus récepteur. Les microorganismes ayant acquis les vecteurs recombinés sont sélectionnés.

RAPPELS : La technologie de l'ADN recombinant

Exemple : Clonage d'un gène dans le plasmide pBR322 (Figure 7)



par étalement des bactéries sur un milieu de culture + Amp → seules les bactéries transformées vont se développer sur ce 1er milieu ($Amp^R Tet^?$). Ensuite, les colonies apparues sur ce milieu seront repiquées sur un milieu contenant Amp + Tet → seules les bactéries transformées par un plasmide non recombinant vont se développer sur ce 2ème milieu ($Amp^R Tet^R$). les colonies qui ont poussé sur le 1er et non sur le 2ème sont celles transformées par un plasmide recombinant ($Amp^R Tet^S$)

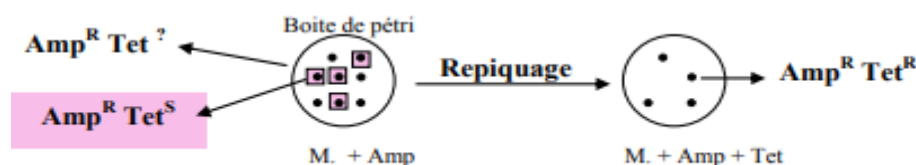


Figure 7. Clonage d'un gène dans le plasmide pBR322

2. Les banques d'ADN

2.1. Les banques d'ADN génomique

Un des progrès considérable en génétique a été la mise en place d'approche permettant d'obtenir la séquence des génomes. L'une d'entre elle consiste à stocker les séquences de génome entier, ce sont les banques d'ADN, qui ont contribué grandement dans l'essor de la discipline.

2.1.1 Etablissement de la banque d'ADN

La création d'une banque d'ADN a pour objectif de stocker et de multiplier un génome entier pour un organisme donnée et cela à terme afin de séquencer le génome.

La création d'une banque passe par différentes étapes, après extraction de l'ADN génomique, une sonication ou une digestion enzymatique est réalisée afin de le fragmenter. Les fragments purifiés sont clonés dans des vecteurs dédiés de telle sorte que chaque fragment se retrouve inséré dans un vecteur. Suite à cela les vecteurs recombinés sont introduits dans le microorganisme récepteur. Après sélection des clones (microorganismes) transformés ces derniers sont multipliés et stockés. A ce stade la banque d'ADN est nommée banque nonordonnée car les clones possédant des séquences d'ADN successives au sein du génome ne sont pas connus (Figure 8). Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin d'ordonner les clones tel que l'hybridation de sonde, la digestion partielle ou par séquençage des extrémités de chaque insert.

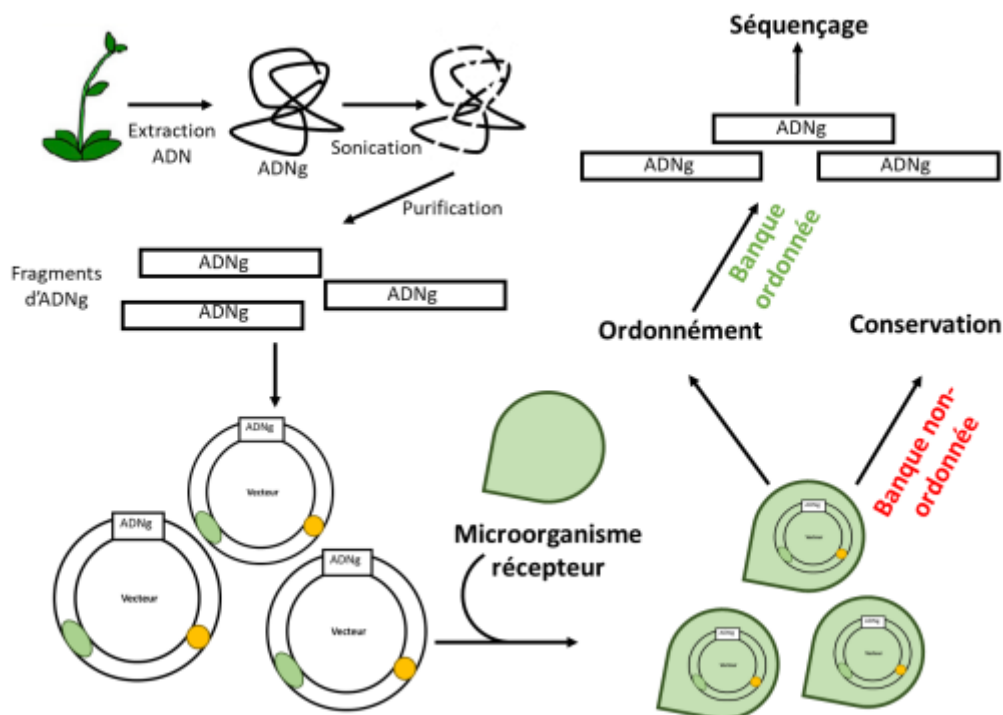


Figure 8. Les étapes relatives de la création des banques. L'ADN de l'organisme étudié est extrait puis fragmenté et les fragments sont purifiés. Ces derniers sont clonés dans des vecteurs qui sont introduits dans un microorganisme. Les individus transformés sont sélectionnés puis conservés ce qui permet l'obtention d'une banque d'ADN non-ordonnée. L'ordonnement des clones consiste à connaître ceux qui possèdent les fragments d'ADNs successifs dans le génome.

2.2. Les banques d'ADNc

Les banques d'ADNc sont des banques produites à partir d'ADN complémentaire issus de la reverse transcription des ARNm. Elle vise à stocker au sein d'une banque l'ensemble des transcrits produit dans un organisme ou un tissu dans une condition donnée et reflète les parties du génome qui sont exprimés. Après conversion des ARNm en ADN complémentaires, ces derniers sont clonés dans des vecteurs et introduits au sein de microorganismes qui sont multipliés et conservés.

2.2.1. Le passage de l'ARN à l'ADN

La transformation des ARNm en ADN complémentaire passe par l'action d'une reverse transcriptase qui est une ADN polymérase synthétisant de l'ADN à partir de l'ARN. En fonction du type d'ARNm à reverse transcrire eucaryotique ou procaryotique, des oligonucléotides polythymine (pour les eucaryotes) ou des hexamères aléatoires (pour les procaryotes) sont respectivement utilisés. Après hybridation des oligonucléotides la reverse transcriptase se fixe sur le duplex ARN-ADN et procède à la biosynthèse d'ADN à partir de l'ARNm. Par la suite l'ARN est éliminé sous l'action d'une ARNase ou de la soude. L'ADNc simple brin est ensuite transformé en double brin sous l'action d'une ADN polymérase. Des sites de restrictions peuvent être introduits aux extrémités des ADNc par la ligation d'adaptateurs (séquence d'ADN possédant des sites de restrictions).

3. Les banques d'ADN

C'est l'ensemble de clones bactériens ayant incorporé différents plasmides recombinants. Une banque d'ADNc est fabriquée à partir des régions transcrites du génome et une banque génomique est fabriquée à partir de séquences géniques et intergéniques.

4. Criblage de la banque

Il consiste à la recherche du clone ayant inséré le fragment d'ADN qu'on désire étudier. Il nécessite la réplique de la banque.

Exemple : Criblage de la banque par Hybridation moléculaire avec une sonde marquée pour la recherche d'un gène particulier tel que le gène qui code pour la synthèse de l'hormone de croissance (HG).

5. Les sondes

Il existe 2 types de sondes :

➤ Les sondes qui reconnaissent les protéines = anticorps marqués

On a recours à cette technique lorsqu'on n'a aucune connaissance sur la séquence des acides aminés de la protéine. Dans ce cas, on purifie la protéine à partir de l'organe pour obtenir des anticorps dirigés contre le produit protéique du gène recherché. Les clones positifs seront révélés grâce au marquage (radioactif ou non radioactif) des anticorps. Donc en identifiant la protéine, l'anticorps identifie le clone contenant le gène qui a dû synthétiser cette protéine.

➤ Les sondes qui reconnaissent les acides nucléiques (ADN et ARN) = sondes nucléotidiques

C'est tout fragment d'acide nucléique simple brin (ADNc, fragment PCR, oligonucléotide, ARN) de taille très variable et qui possède une homologie de séquences avec l'ADNc ou le gène recherché.

Obtention

- par synthèse chimique si on connaît la séquence de l'ADN à étudier. Si cette séquence est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et retrouver la séquence d'ADN grâce au code génétique (Cf. exemple plus loin).
- une sonde peut être un ADNc dont seulement une partie sera utilisée (après digestion et clonage des fragments obtenus)
- une sonde peut être de l'ARNm

5.1. Hybridation moléculaire de la sonde

La sonde permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde – fragment correspond à une réaction « d'hybridation moléculaire ». Celle-ci nécessite des conditions physico-chimiques parfaites (tampon, pH, t°...) appelées strigence et dépend de la longueur de la sonde et de la complémentarité sonde – fragment avec possibilité de mésappariement. Elle doit être complémentaire et anti// au fragment recherché, qui lui aussi doit être dénaturé (simple brin). Pour repérer cette réaction d'hybridation sonde-ADN recherché, il faut réaliser un marquage de la sonde.

6. Marquage

Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage. Le marquage d'une sonde est réalisé soit avec un atome radioactif = radio-isotope (= isotope radioactif) : c'est le « marquage radioactif à chaud»

(par une sonde radiomarquée) et le clone positif (contenant le gène recherché) est révélé par une tache noire par autoradiographie; soit avec un « colorant fluorescent » : c'est le « marquage enzymatique ou fluorescent à froid » non radioactif. Dans ce cas, le clone positif est révélé par une tâche fluorescente brillante.

Globalement, le marquage se fait soit à l'extrémité soit à l'intérieur du fragment d'ADN :

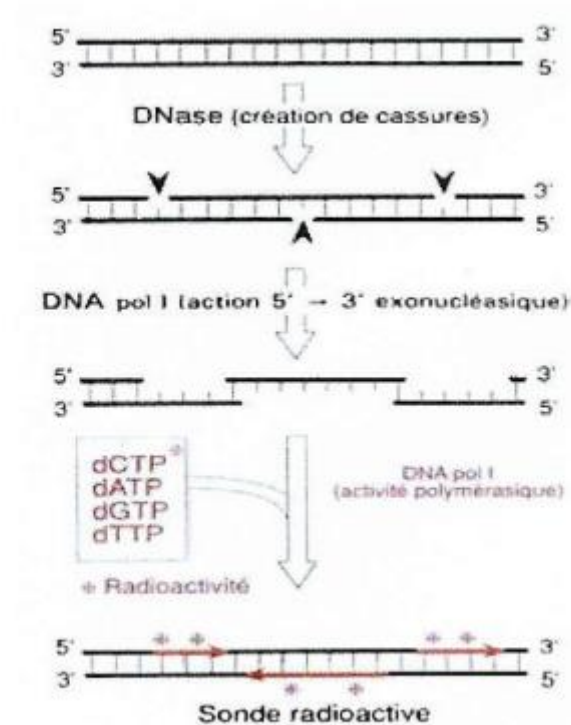
- marquage aux extrémités : voir exemple plus loin

6.1. Marquage interne

- Technique « nick translation » = coupure-réparation : Clivage au hasard de l'ADNdb par la Dnase I, puis réparation des coupures par l'ADN pol I en présence de « dNTP → ^{32}P » (c'est-à-dire dNTP radiomarquée en position par l'isotope ^{32}P)

- Technique « random priming » (amorçage au hasard) : les 2 brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage/refroidissement brutal. Puis on ajoute un mélange d'hexanucléotides de synthèse correspondant à toutes les combinaisons possibles ($4^6 = 4096$). Ces oligo vont s'hybrider avec la sonde par une partie d'entre eux (Figure 9).

Donc on ne peut synthétiser une sonde nucléotidique que lorsqu'on connaît le produit protéique du gène recherché et sa séquence d'acides aminés.



Marquage par transfert de coupure (Nick translation)

● marquage interne par amorçage aléatoire (random priming)

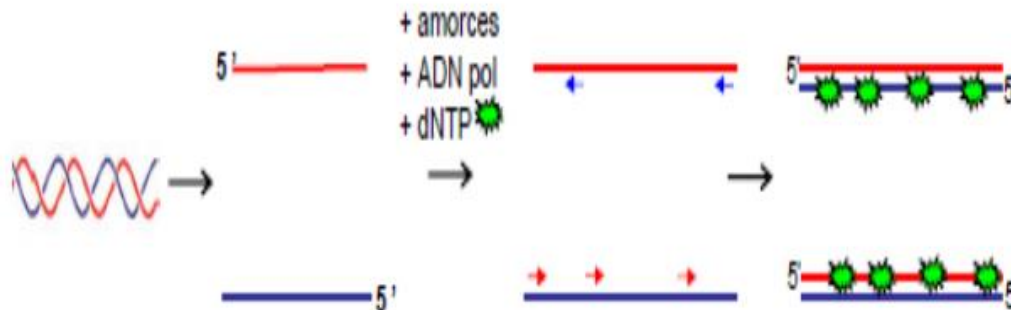


Figure 9. Technique de marquage interne

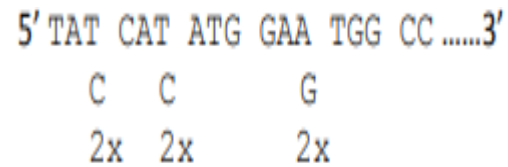
6.2. Principe de la technique d'hybridation moléculaire avec une sonde ADN radio marquée aux extrémités 5'P

Elle consiste à identifier dans une banque d'ADN, les clones bactériens comportant une séquence d'ADN par hybridation avec une sonde radiomarquée. Pour cela, il est nécessaire de connaître une partie de la séquence recherchée qu'on peut déduire à partir des acides aminés de la protéine correspondante.

① **Choix d'un segment d'acides aminés** (de la protéine correspondante au gène recherché) avec le minimum de dégénérescence possible : Exemple d'une courte séquence de protéine utilisée pour fabriquer un ensemble d'oligonucléotides dégénérés utilisables comme une sonde pour retrouver le gène codant la protéine.

	6	2	2	1	2	1	4	
NH2	Ser	Tyr	His	Met	Glu	Trp	Pro COOH
UCN	UAU	CAU	AUG	GAA	UGG	CCN		Des sondes ADN synthétiques sont fabriquées à partir des données du code génétique. Cette séquence d'AA est traduite en sens inverse pour obtenir la séquence d'ADN qui l'a codée. Cependant, en raison de la dégénérescence du code génétique, plusieurs séquences d'ADN pourraient avoir codé la protéine en question.
AGU	UAC	CAC		GAG				
AGC								

② **Synthèse chimique** (synthétiseur d'oligo) des oligonucléotides de toutes les combinaisons possibles correspondant à cette région (encadrée).



Les séquences possibles de la sonde de 17 bases :

□ Le coefficient de dégénérescence = nombre de combinaisons des séquences de la sonde = 2^3 = 8. L'un des oligonucléotides de la sonde correspondra exactement au gène recherché.

③ Marquage des 8 séquences

Le plus simple est le marquage de l'extrémité 5' par la T4 PK (=T4 polynucléotide kinase qui est une kinase qui ajoute des groupements phosphates). Dans notre cas, la T4 PK transfère le groupement phosphate (en position gamma γ = la position la plus externe) à partir d'une molécule d'« ATP γ = ^{32}P » (ATP radiomarquée en position γ par l'isotope ^{32}P) sur l'hydroxyle 5' de l'ADN de la sonde préalablement déphosphorylé. Au lieu de ce marquage radioactif, on peut réaliser le marquage fluorescent à froid à l'aide du dUTP marqué à froid à l'isotope ^{35}S . Ce marquage est moins sensible mais moins dangereux que le marquage radioactif (Figure 10).

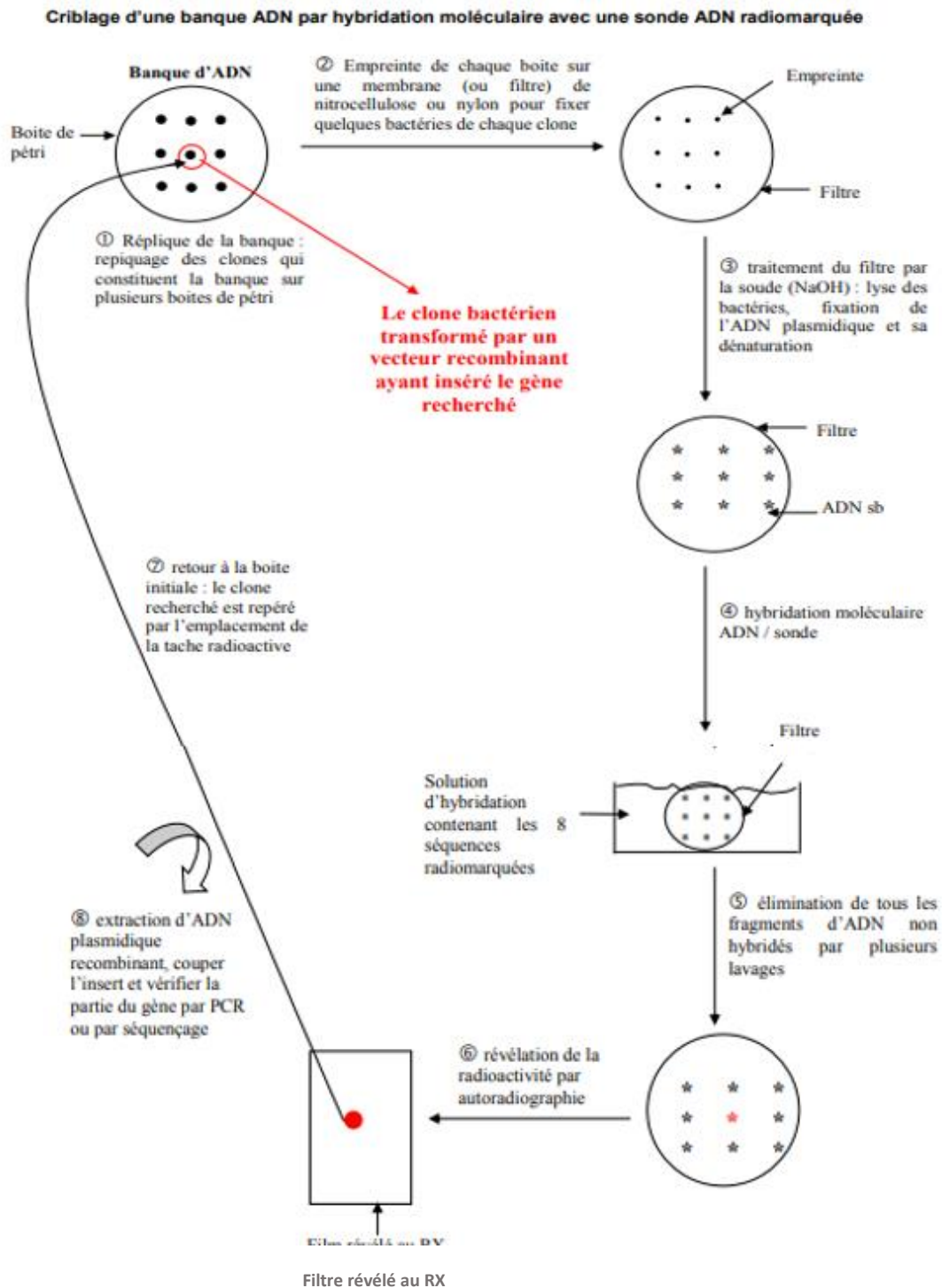


Figure 10. Criblage d'une banque ADN par hybridation moléculaire avec une sonde ADN radiomarquée.

Références bibliographiques

- Brown, T. A. 2016. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 7th Edition. 7th Editio.ed. Wiley-Blackwell.
- Chen, Bing-Yuan, and Harry W Janes. 2002. PCR Cloning Protocols. Second Edi. HumanaPress.
- Green, Michael R., and Joseph Sambrook. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Fourth Edi. ed. U.S Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Primrose, Sandy B., and Richard Twyman. 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. First Edit. ed. Wiley-Blackwell.
- Sambrook, Joseph F., and David Russell. 2006. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual. First Edit. ed. U.S Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tagu, Denis, and C. Moussard. 2006. Techniques for Molecular Biology. First Edit. ed. CRC Press.



Chapitre 2 : Identification et isolement des gènes d'intérêt

1. Identifier et isoler un gène d'intérêt

L'identification des gènes consiste d'abord à choisir le caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme les caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, certaines maladies, les herbicides. Ensuite, il faut procéder à l'isolement et au clonage du gène à l'origine du caractère recherché. Ce gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, végétal, animal ou bactérie, puisque le code génétique est universel. Les travaux de génétique direct visent toujours à cloner le gène sauvage correspondant. Parmi les stratégies utilisées pour rechercher des gènes, la première (peu utilisée) consiste à rechercher des gènes dans les espèces par synténie. La deuxième stratégie (la plus courante) comporte plusieurs étapes : - attribution du gène à un chromosome, - cartographie précise du gène sur le chromosome, - clonage du gène. Selon la plante étudiée, cette tâche est plus ou moins difficile ; elle est relativement facile chez *Arabidopsis*, plante modèle de laboratoire dont le génome est entièrement séquencé depuis 2000. Mais c'est plus difficile chez les plantes où le génome est en cours de séquençage, tels que (le riz, le maïs) et extrêmement difficile chez les plantes qui sont rarement étudiées en laboratoire (peu ou pas de ressources disponibles).

1.1. La synténie

On retrouve chez des espèces différentes (mais proches) des blocs de gènes étroitement liés. Ces blocs sont le résultat d'inversions ou de translocations (cassure de chromosomes) qui ont été conservées durant l'évolution : c'est la synténie c'est à dire la présence simultanée sur le même chromosome de deux ou plusieurs loci, indépendamment de leur liaison génétique. La notion de synténie est de plus en plus utilisée pour décrire la conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées. Dans ce cas, la localisation de plusieurs gènes peut être prédite grâce à un modèle de données. Les comparaisons entre espèces phylogénétiquement éloignées révèlent une augmentation de la perte de synténie (Figure 11).

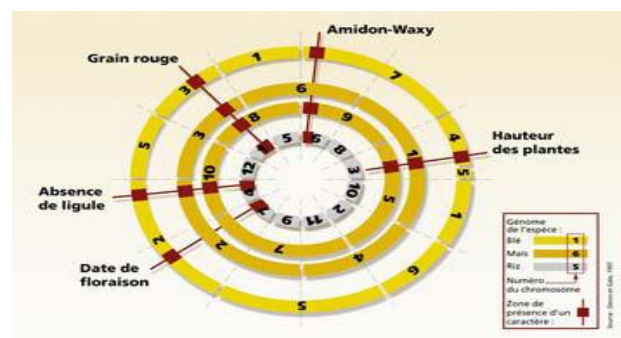
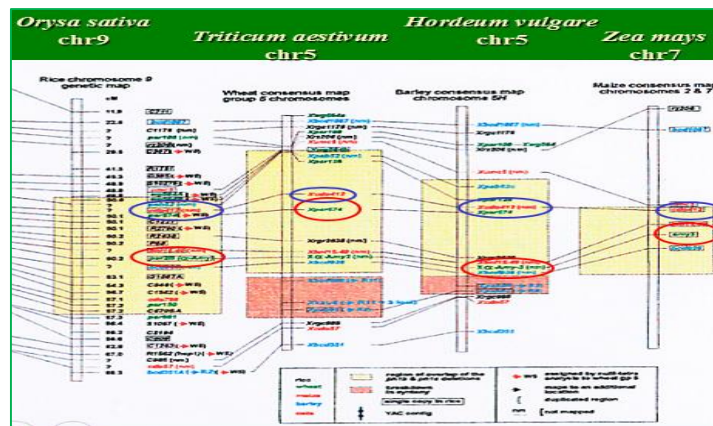


Figure 11. Autres représentation de la synténie.



La synténie peut permettre de positionner rapidement un gène (Amy) chez le maïs, si sa position est connue chez le riz et qu'il fait partie d'un bloc synténique.

1.2. Attribution d'un gène à un chromosome

Pour attribuer un nouveau gène à un chromosome, on recherche une liaison génétique (traduisant une liaison physique) entre le gène et des marqueurs déjà positionnés sur la carte génomique.

1.2.1. Cartographie génétique

C'est par l'étude des liaisons entre gènes que la théorie chromosomique de l'hérédité a pu être formulée par Morgan (premiers travaux de 1911, et formulation précise en 1934). La démarche est assez simple, quand elle s'applique à des caractères qualitatifs. Au niveau d'une F_2 du croisement de deux lignées qui diffèrent pour les allèles présents à deux locus l'étude de la ségrégation des allèles va permettre de dire si les locus correspondants sont proches l'un de l'autre. En effet, s'ils sont proches l'un de l'autre, les allèles qu'ils portent tendent à être distribués conjointement (phénomène de coségrégation) dans les gamètes donnés par la F_1 , il y aura donc un excès de gamètes parentaux par rapport aux gamètes recombinés. Si les deux types de gamètes sont présents à des fréquences comparables, il ne sera pas possible de déterminer si les locus sont éloignés sur un même chromosome ou s'ils sont situés sur deux chromosomes différents. Si l'on dispose d'un grand nombre de marqueur, grâce aux marqueurs moléculaires il devient possible de résoudre le problème. Il suffit d'étudier les liaisons deux à deux entre tous les locus marqueurs. Comme la liaison entre deux locus marqueurs dans une information sur leur proximité, si un locus 1 est lié fortement à un locus 2, lui-même lié fortement à un locus 3, mais si ce dernier et moins lié au locus 1, on en conclut que l'ordre des

locus marqueurs sur le chromosome est 1-2-3, et ainsi de suite avec plusieurs centaines de marqueurs. On arrive ainsi à ordonner tous les locus qui sont liés entre eux : ils forment un groupe de liaison. Si le marquage est insuffisamment dense ou s'il y a un manque de polymorphisme des marqueurs dans certaines régions, on trouvera plus de groupe de liaison que de chromosomes. Mais si le marquage est suffisamment dense, avec suffisamment de polymorphisme, alors le nombre de groupes de liaison se réduit au nombre de chromosomes. Cette cartographie des liaisons entre marqueurs constitue ce que l'on appelle la carte génétique, qu'il faut bien distinguer de la distance physique entre deux locus, basée sur le nombre de base qui les sépare. Les populations utilisées pour réaliser la cartographie ne sont pas nécessairement des F_2 ; il peut s'agir aussi de populations dérivées de cette F_2 sans sélection (F_3 , F_4 ...) ou de populations obtenues par haplodiploidisation dès la F_1 , ce qui donne accès directement à la structure des gamètes de la F_1 . Enfin, il peut s'agir de populations issues de recroisement avec les parents. Toutes ces populations ont en commun le fait que toute tendance à une coségrégation entre deux allèles ne pourra être due qu'à une liaison physique.

1.2.2. La cartographie physique

La carte physique est l'ordonnancement de fragments clonés chevauchants reconstituant la molécule d'ADN de départ (Figure 12). C'est à partir de cette carte que sera choisi l'ensemble minimal de fragments assurant la couverture complète du génome à séquencer. Les distances, mesurées en paires de bases (pb), entre les différents marqueurs sont dites absolues. L'établissement d'une carte physique utilise les données des cartes de liaison et des informations de recouvrement partiel entre les fragments clonés permettant de définir des groupes de chevauchements.

L'objet de la cartographie physique est de localiser les gènes sur les chromosomes. Pour cela, des techniques d'hybridations *in situ* ou d'analyses de lignées cellulaires hybrides peuvent être utilisées. Ces méthodes permettent d'assigner à leur chromosome, des gènes placés sur la carte génétique. Beaucoup de gènes peuvent être localisés physiquement alors qu'ils ne le sont pas génétiquement. Ceci car les méthodes d'hybridation ne se limitent pas aux gènes polymorphes comme c'est le cas pour les méthodes de cartographie génétique par croisement. Notons que l'ordre est toujours le même sur une carte génétique et une carte physique. Seules les distances relatives changent.

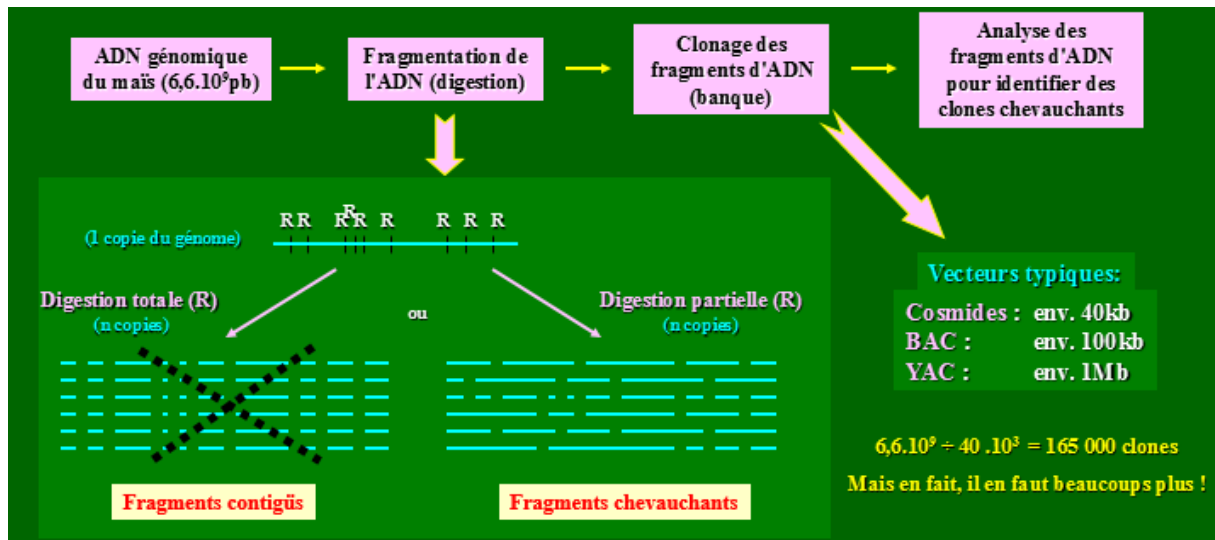
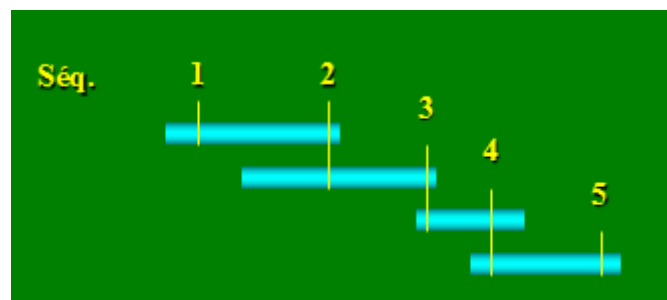


Figure 12. Détermination de l'ordre des clones (séquençage de courtes régions des clones) pour former des contigs.



Au final, on obtient autant de contigs que de chromosomes de l'espèce

Les cartes génétiques et physiques sont combinées (positionnement de marqueurs génétiques sur la carte physique). La carte physique sera utilisée :

- ✓ Comme base pour le clonage de nouveaux gènes d'intérêts.
- ✓ Pour les projets de séquençage des génomes.

2. Méthodes d'identification et isolement d'un gène

Les méthodes principales pour identifier et isoler un gène chez une plante sont :

1. **Homologie de séquence** : Dans le cas où le gène recherché a déjà été cloné chez une espèce voisine.
2. **Recherche et analyse de mutant(s)**

3. **Interrogation de banques de données (recherche *in silico*)** : Pour les espèces dont le génome est entièrement séquencé (comme *A. thaliana*, très bientôt le riz, et d'autres à venir).

2. 1. Identification d'un gène par homologie de séquence

Pour isoler un gène, on peut travailler à rebours à partir de son produit protéique. Tout d'abord, au moins une partie de la protéine est séquencée, ce qui signifie que l'ordre des acides aminés qui constituent la chaîne protéique est déterminé. En général, il suffit de connaître les 30 premiers acides aminés de la protéine. Ensuite, selon la séquence connue d'acides aminés et si l'on comprend le processus de synthèse des protéines, on peut prédire la séquence de nucléotides d'une partie de la matrice d'ARN messenger de la protéine.

Ensuite, on construit une **sonde d'ADN** monocaténaire complémentaire de la séquence prévue d'ARN messenger. Par exemple, si une partie de la séquence prévue d'ARN messenger est CUA GUA CGA, la section correspondante de la sonde d'ADN serait GAT CAT GCT, car G s'associe à C et A à T. (En fait, en raison de certains détails structurels relatifs aux molécules d'ADN, la séquence complémentaire devrait réellement s'écrire comme suit : TCG TAC TAG, qui correspond à GAT CAT GCT à l'envers. Toutefois, nous utilisons un format techniquement incorrect ici, pour éviter la confusion.) La sonde d'ADN est conçue pour être radioactive, de sorte qu'elle soit décelable lorsqu'elle se lie à son « image symétrique » d'ADN.

La sonde d'ADN monocaténaire est ensuite incubée avec un échantillon censé contenir la matrice complète de la protéine d'ARN messenger. Lorsque nous isolerons l'ARN messenger auquel se lie la sonde d'ADN, nous aurons probablement trouvé l'ARN messenger que nous cherchions.

Une fois que l'on a trouvé le brin d'ARN messenger, il suffit de travailler à rebours -- nous devons synthétiser le brin d'ADN qui aurait servi de matrice pour l'ARN messenger. Il nous faut synthétiser de l'ADN à partir d'ARN. Il existe un enzyme appelé **transcriptase inverse** qui nous permet de faire cela. On retrouve cet enzyme dans certaines particules de virus appelées **rétrovirus**. Ces virus emploient l'ARN comme matériel génétique et utilisent la transcriptase inverse pour générer de l'ADN une fois qu'ils ont infecté une cellule hôte. Les biotechnologistes peuvent mélanger une transcriptase inverse avec des ARN messagers *in vitro* (à l'extérieur de cellules vivantes, en laboratoire, généralement dans un petit tube en plastique). Par conséquent, la séquence d'ADN pour le gène recherché est synthétisée par l'enzyme, selon le brin d'ARN messenger présenté. Comme

l'ADN produit a été fabriqué de manière artificielle en vue d'être complémentaire de l'ARN messager, on l'appelle **ADN complémentaire**.

2.2. Isolement et identification du gène d'intérêt par Southern blot

Recherche d'un gène (cloné et provenant d'une espèce de plante) à partir de l'ADN génomique d'une plante obtenu par fragmentation du génome par des enzymes de restriction en utilisant la technique d'hybridation moléculaire par Southern blot (Figure 13). C'est une technique d'hybridation moléculaire qui consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires (sonde) marquées par un radio-isotope.

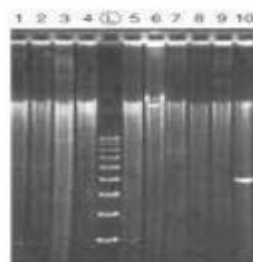
Les étapes

Extraction de l'ADN génomique d'une plante



Digestion par différentes enzymes de restriction

Séparation des fragments d'ADN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose (séparation d'une traînée continue de bandes d'ADN en fonction de leur taille et dont l'une d'elles correspond au gène recherché qui sera identifiée par la sonde marquée après Southern blot).



Dénaturation des fragments d'ADN digérés par traitement alcalin (acide) du gel d'électrophorèse



Southern blot

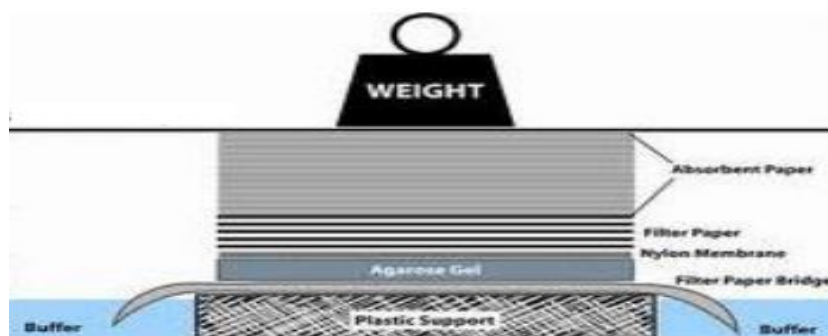
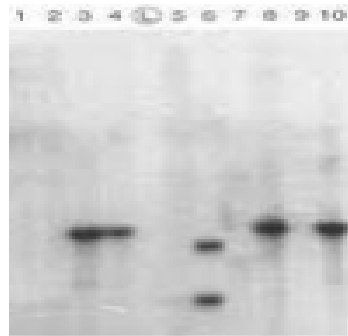


Figure 1 3. Transfert par capillarité des fragments d'ADNs séparés sur une membrane poreuse souple (feuille de nylon).

- + **Fixation de l'ADNsb** sur la membrane (par cuisson de la membrane ou par exposition sous UV)
- + **Hybridation moléculaire de l'ADN** fixé à la membrane avec une sonde radio-marquée dénaturée.
- + **Lavages Autoradiographie** (La membrane est mise en contact avec un film photographique)
- + **Révélation** du film pour révéler les bandes d'ADNsb hybridées dont la séquence est homologue à celle de la sonde (ces bandes sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc). La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments) (Figure 14).



Film photographique révélé

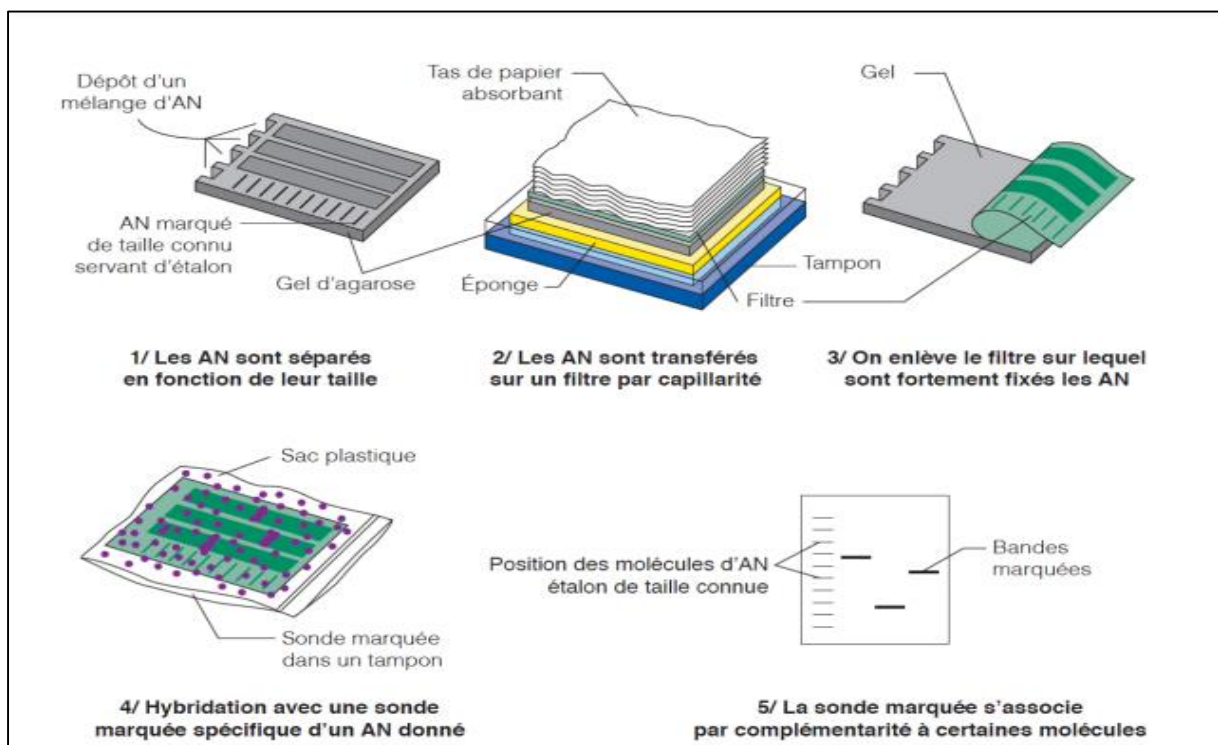


Figure 14. Technique d'hybridation moléculaire par Southern blot.

3. Identification et isolement d'un gène par recherche de variants (mutants)

La recherche de variants (mutants) consiste à étudier des fragments d'ADN apparus ou disparus dans un génome au cours du temps, ou certaines modifications ponctuelles de l'ADN. L'approche la plus adaptée pour l'identification et isolement d'un gène par recherche de variants (mutants) consiste à une étude sur l'ensemble des mutations sur le génome, un reséquençage, pour une mutation (mutation ponctuelle ou indel) dans un gène cible connu, un séquençage Sanger restreint à une région définie du génome. La PCR et la qPCR sont deux approches envisageables dans la recherche de mutations si la connaissance de la séquence concernée est de moindre importance.

3.1. Différents types de mutation

Plusieurs types de mutations peuvent être observés entraînant des effets différents sur les gènes. Les mutations de transition entraînent des substitutions entre bases de même type (pyrimidine ou purine), tandis que les mutations de transversion entraînent la substitution des bases pyrimidiques par des bases puriques et inversement. Les mutations peuvent augmenter ou diminuer l'effet d'un gène en fonction de sa position ; les effets knock-in et knock-down, respectivement, annulent l'effet d'un gène ; knock out (KO). Des mutations affectant le promoteur peuvent réduire ou annuler son activité si la modification affecte les éléments cis, à l'inverse, certaines mutations altèrent le profil d'expression ou augmentent l'activité du promoteur en mimant le motif cis. Les mutations affectant le cadre de lecture ouvert peuvent être inefficaces si la mutation affecte une séquence non codante (telle qu'un intron) ou si la mutation est non-sens (ne modifie pas les acides aminés). Si la mutation se produit dans la séquence codante du gène, elle peut avoir un effet si elle affecte sévèrement la séquence de la protéine, comme dans le cas de l'intégration d'une mutation codant stop au milieu de la séquence entraînant une troncature de la protéine, ou l'addition ou la réduction de 1 ou 2 de nucléotides, provoquant un décalage dans le cadre de lecture, entraînant une modification drastique de la séquence protéique. D'une manière plus subtile, les mutations peuvent changer les acides aminés clés dans l'activité d'une protéine, entraînant des changements d'activité, par exemple, les mutations entraînent l'ajout d'acides aminés chargés négativement (tels que l'acide aspartique) Phosphorylation de la région de la protéine responsable de son activation se traduit par une activité constitutive de formation de protéines.

Sources naturelles de mutagenèse plusieurs événements peuvent produire naturellement des mutations dans le génome, et des facteurs chimiques ou physiques présents dans

l'environnement peuvent provoquer des mutations. C'est le cas des rayons UV, qui induit la formation de dimères de thymine entre deux bases adjacentes, provoquant leur dissociation de l'adénine correspondante. Le mécanisme de réparation de l'ADN responsable de la modification des nucléotides peut, dans certains cas, faire des erreurs et introduire, par exemple, des nucléotides G ou C. D'autre part, des mécanismes biologiques tels que la recombinaison entre deux molécules d'ADN conduisant à l'échange de fragments entre les deux brins sont des sources de mutation spontanée. Au moment de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase peut introduire des erreurs lors du processus en changeant le nucléotide, particulièrement si l'enzyme est dépourvue d'activité d'autocorrection « proof reding ». Elle peut aussi provoquer la réduction ou l'ajout de nucléotides par glissement, ceci est particulièrement observé au niveau des séquences répétées ou riche en A-T.

3.2. L'approche de génétique directe et génétique reverse en recherche

Dans la recherche moderne, il existe deux méthodes pour identifier les gènes impliqués dans un processus donné, la première est la méthode sans a priori, qui consiste à générer des mutations spontanées dans le génome de manière artificielle et aléatoire. Le criblage est réalisé après mutagenèse pour identifier les mutants aux phénotypes intéressants. Les gènes responsables du phénotype sont ensuite identifiés, cette approche est appelée « génétique directe ». La deuxième approche, appelée génétique reverse, consiste à introduire de manière ciblée des mutations dans des gènes susceptibles d'être impliqués dans des processus étudiés par mutagenèse dirigée. Le phénotype des mutants est observé pour valider ou annuler le rôle du gène (Figure 15). Avec la découverte des séquences du génome et la découverte des gènes d'un organisme donné, la génétique inverse est apparue.

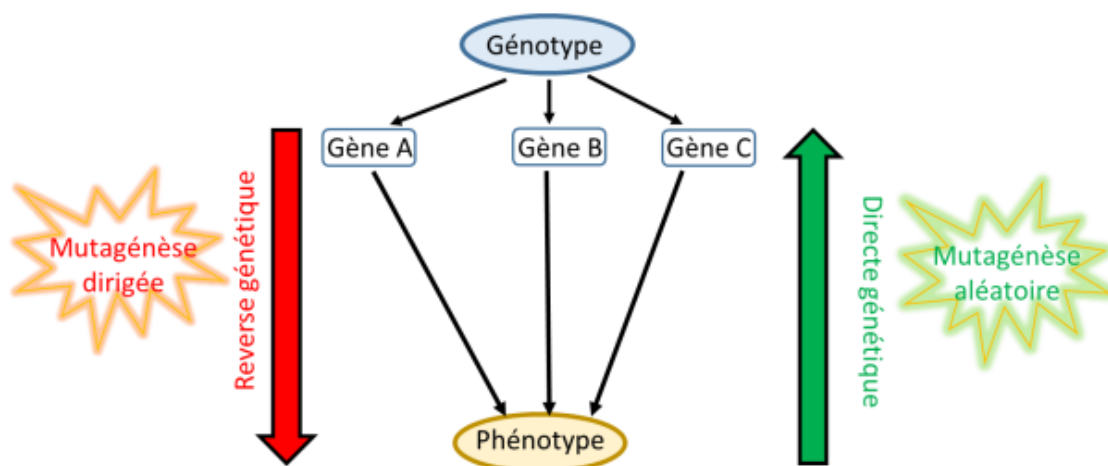


Figure 15. La génétique directe et reverse en recherche.

La génétique directe repose sur la création de mutations aléatoire, puis l'isolation de mutant ayant un phénotype en adéquation avec le processus étudié, le gène responsable est par la suite identifiée. La génétique reverse repose sur la connaissance du génome, les gènes d'intérêts sont mutés de manière ciblée puis le phénotype du mutant est analysé.

3.3. La mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire est utilisée en génétique directe pour identifier les gènes impliqués dans un processus biologique donné. Les mutations générées aléatoirement affectent la séquence du génome, et elles doivent être saturées pour affecter le nombre maximum de gènes, par exemple dans le cas de la mutagenèse à l'agent chimique EMS (Ethyl Methyl Sulfonate) un nombre moyen de 5×10^2 à 5×10^4 des modifications ont lieu par gène pour un génome donnée. Plusieurs mutagènes sont disponibles pour générer des mutations spontanées dans le génome. Le choix de la méthode utilisée dépend principalement de l'organisme étudié. Par exemple, la mutagenèse de l'ADN-T, qui implique l'introduction d'ADN modifié du pathogène *A. tumefaciens* dans les cellules végétales, ne peut être appliquée qu'à certaines espèces hôtes du pathogène.

3.3.1. Mutagenèse par agents chimique

La mutagenèse chimique consiste à traiter des cellules grâce à des agents chimiques qui provoquent la formation de mutations. Trois catégories de mutagènes chimiques sont identifiées. La première provoque des modifications de nucléotides en miment et remplacent des bases azotées, c'est le cas par exemple du 5-Bromouracil qui est un analogue de la thymine et qui s'apparie à la guanine. La deuxième catégorie de mutagène chimique provoque la modification de bases azotées, dans le cas de l'EMS, entre autre une modification de la guanine en O6-méthyle guanine a lieu, cette base s'apparie à une thymine provoquant ainsi une transition de pair de nucléotide de G-C en A-T. La troisième catégorie d'agents chimiques est représentée par les intercalants de l'ADN, tel que le bromure d'etidium utilisé en biologie moléculaire pour la révélation de l'ADN. Les intercalant de l'ADN s'introduisent entre les pairs de bases et provoque des distorsions au niveau de la séquence aboutissant à la formation de mutation.

3.3.2. Mutagenèse par agents physique

L'irradiation aux UV de cellules introduit des mutations, ces dernières peuvent être corrigées dans certain cas par le système enzymatique photolyase/glycocylase qui remplace

les nucléotides endommagés, par ailleurs si le nombre de mutations est trop important le système est saturé et un nombre conséquent de mutation sont introduites. Le bombardement aux neutrons est un autre type de mutagenèse physique, elle consiste dans la projection de neutron par un canon à particule sur une molécule d'ADN. Cela provoque des cassures d'ADN, l'introduction de mutation à lieu lors de la réparation des brins cassés.

3.3.3. Mutagenèse insertionnelle à l'ADNT

La mutagenèse insertionnelle à l'ADNT consiste à utiliser une version modifiée du plasmide Ti dont les gènes de l'ADNT ont été remplacés par un ou des gènes de sélection (gène de résistance aux antibiotiques et/ou de résistance à un herbicide). Le plasmide Ti modifié est réintroduit dans la bactérie et le processus d'infection est recrée artificiellement de telle sorte que l'ADNT modifié intègre le génome de l'hôte. Au cours du processus plusieurs milliers d'ADNT sont insérés dans le génome assurant ainsi une bonne saturation de ce dernier en mutation.

3.4. Le crible de mutants

Après un processus de mutagenèse aléatoire, des centaines de mutants ont été obtenus, chacun avec des dizaines de milliers de mutations. Certains mutants présentaient des mutations sans interts par rapport au processus biologique étudié, tandis que d'autres présentaient des mutations intéressantes qui amplifiaient ou bloquaient le phénomène. Le criblage consiste à sélectionner des mutants porteurs de mutations intéressantes qui affectent de manière significative les gènes impliqués dans le processus.

Deux principaux types de cribles peuvent être utilisés :

- i) i) Le premier est un crible phénotypique largement utilisé pour la recherche, qui est basé sur l'identification de mutants qui contiennent une variation phénotypique selon le processus à l'étude dans les conditions expérimentales dans lesquelles le processus se produit. Par exemple, pour étudier la motilité bactérienne, il faut rechercher des mutants à motilité altérée ou altérée.
- ii) Le deuxième type est le crible moléculaire, il est utilisé quand les variations phénotypiques sont absente ou trop subtiles pour être détectées. Dans ce cas une analyse d'expression de gènes ciblent préalablement identifiés comme activés par le processus peut être réalisée chez des mutants, afin d'identifié des individus dans

lequel le processus est invalidé ou altéré. La figure 16 résume les principales étapes expérimentales en génétique directe.

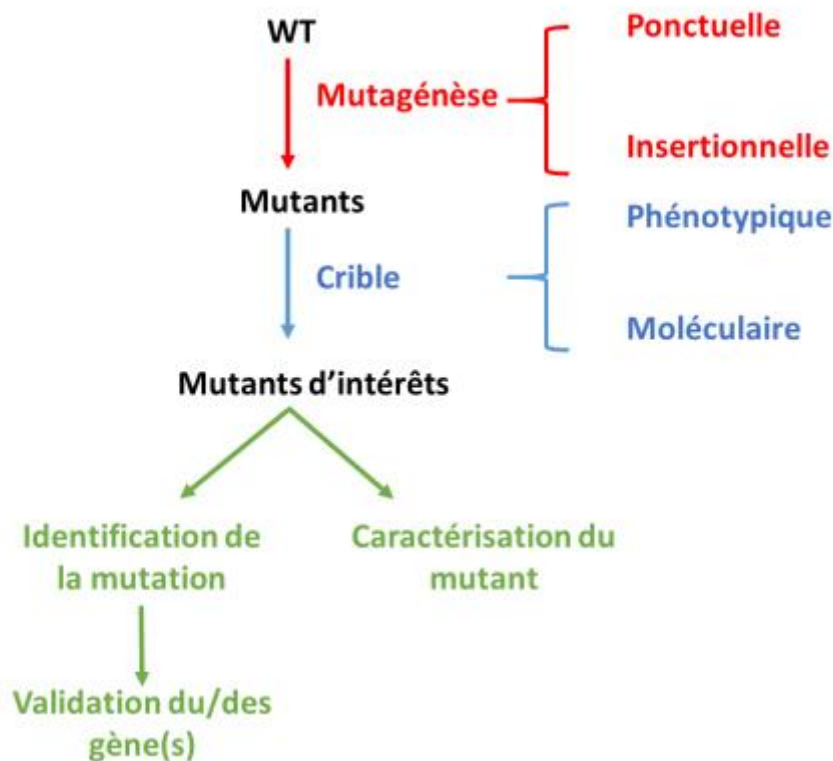


Figure 16. Principales étapes de recherche en génétique directe. A partir d'un individu sauvage (WT) une mutagenèse aléatoire est réalisée ce qui aboutit à la formation de mutants. Un criblage est réalisé afin d'identifier les mutants comportant un phénotype intéressant pour l'étude. Ces derniers sont caractérisés afin de mieux comprendre le rôle du gène muté d'un part et d'autre part le gène responsable du phénotype mutant est recherché.

3.5. Identification de mutations

Une fois les mutants isolés, la localisation des mutations impliquées est essentielle pour identifier les gènes affectés. Il existe plusieurs méthodes pour trouver des mutations, dont le choix dépend du type de mutation réalisée. Les mutants doivent d'abord subir une série de croisements (backcross) avec un fond sauvage pour purifier le fond génétique et éliminer les mutations parasites. Habituellement, un croisement inverse accompagne le processus d'identification des mutations.

3.5.1. Identification de mutations ponctuelles

Pour les mutations ponctuelles, telles que celles obtenues par mutagenèse EMS, une analyse de co-ségrégation des marqueurs moléculaires avec les phénotypes peut être effectuée sur la lignée de ségrégation ; obtenue par back cross. Dans la plupart des cas, la descendance obtenue suivait une distribution mendélienne avec ou sans présence d'un phénotype mutant. Un génotypage par amplification spécifique de marqueurs est réalisé pour chaque plantes, puis comparé à la lignée sauvage afin d'identifier les variabilités. A l'issue de l'analyse, certains marqueurs sont invariables entre les lignées, tandis que d'autres sont variables, dont certains se sont systématiquement révélés avoir des phénotypes mutants et donc co-ségrégent avec ces derniers. Les régions contenant des marqueurs de co-ségrégation ont été séquencées (analyse de la séquence d'ADN) et comparées aux lignées sauvages pour identifier les mutations. Les nouvelles technologies de séquençage permettent actuellement à moindre coût de séquencer un génome entier et d'identifier des variations d'un nucléotides ou SNP (Single nucleotide permutation), une autre stratégie consiste à re-séquencer le génome de mutant ayant un fond génétique pure et de le comparer avec le sauvage.

3.5.2. Identification de mutation causée par une insertion

L'identification causée par une mutagenèse intentionnelle est relativement plus simple que l'identification d'une mutation ponctuelle, plusieurs approches existent ; l'une d'entre elle consiste à identifier les séquences flanquantes l'ADN insérées au cours de la mutagenèse. Après purification du fond génétique, l'ADN du mutant est extrait, fragmenté et cloné dans des plasmides, puis des bactéries sont transformées. L'insert responsable de la mutation doit contenir un gène de résistance à un antibiotique, ainsi les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu comportant l'antibiotique. Le plasmide des bactéries résistance est extrait et l'insert séquencé. Il comporte deux types de séquences, celles de l'élément mutagène ainsi que des fragments du gène muté flanquant l'élément d'insertion. Le gène est retrouvé via la recherche des séquences identifiées dans le génome.

L'identification par mutagenèse intentionnelle est relativement simple par rapport à celle des mutations ponctuelles, et il existe plusieurs approches dont l'une consiste à identifier des séquences flanquant l'ADN inséré lors de la mutagenèse. Après purification du fond génétique, l'ADN mutant est extrait, fragmenté et cloné dans des plasmides, ensuite des bactéries sont transformées. L'insert responsable de la mutation doit contenir le gène résistant aux antibiotiques, ainsi les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu contenant

l'antibiotique. Le plasmide de bactéries résistantes est extrait et l'insert est séquencé. Il a deux types de séquences, des séquences d'éléments mutagènes et des segments de gènes mutés flanquant les éléments d'insertion. Le gène est retrouvé par la recherche des séquences identifiées dans le génome.

3.6. Validation de gènes candidat

Suite au processus d'identification des mutations, un ou plusieurs gènes potentiellement responsables du phénotype mutant sont identifiés, il faut par la suite valider ces gènes. Deux grandes approches sont employées, la première consiste à identifier d'autre mutant des gènes candidats obtenus indépendamment, la présence d'au moins deux allèles différents du gène muté présentant le même phénotype confirme le rôle du gène. La deuxième approche nommée teste de complémentation fonctionnelle, consiste à introduire une version non-mutée du gène dans le mutant, la restauration du phénotype sauvage valide l'implication du gène.

3.7. Mutagenèse dirigée

Utilisé en génétique reverse, la mutagenèse dirigée consiste à inactiver de manière ciblée un gène préalablement identifié comme potentiellement impliqué dans le processus étudié. Une connaissance préalable du génome est requise, la sélection du gène peut s'effectuer par différents critères ; profil d'expression, fonction putative de la protéine, recherches bibliographiques...etc.

3.8. Mutagenèse en système bactérien & fongique

Les bactéries et certains organismes fongiques réalisent naturellement de la recombinaison homologue qui consiste en un échange de fragments d'ADN entre deux séquences similaires.

Par exemple chez les bactéries, la protéine RecA est impliquée dans la recombinaison homologue (Figure 18). L'approche employée dans ce type d'organisme consiste à introduire une version modifiée du gène cible, cette version est non-fonctionnelle et comporte un gène de sélection (résistance à un antibiotique) flanqué de régions homologues du gène. La construction est introduite dans l'organisme qui procède au remplacement par recombinaison homologue du gène cible. Les bactéries et certains organismes fongiques subissent naturellement une recombinaison homologue, qui consiste en un échange de fragments d'ADN entre deux séquences similaires. Chez les bactéries, par exemple, la protéine RecA est impliquée dans la recombinaison homologue (Figure 17). L'approche employée dans ce type d'organisme consiste à introduire une version modifiée du gène cible, cette version est non-fonctionnelle et

comporte un gène de sélection (résistance à un antibiotique) flanqué de régions homologues du gène. La construction est introduite dans l'organisme qui procède au remplacement par recombinaison homologue du gène cible. La construction est introduite dans un organisme qui a été remplacé par une recombinaison homologue du gène cible. Les microorganismes ayant intégrés la construction sont sélectionnés via le gène de résistance. Suite à cela la région génomique contenant le gène cible est re-séquencée afin de confirmer son remplacement par la version tronquée.

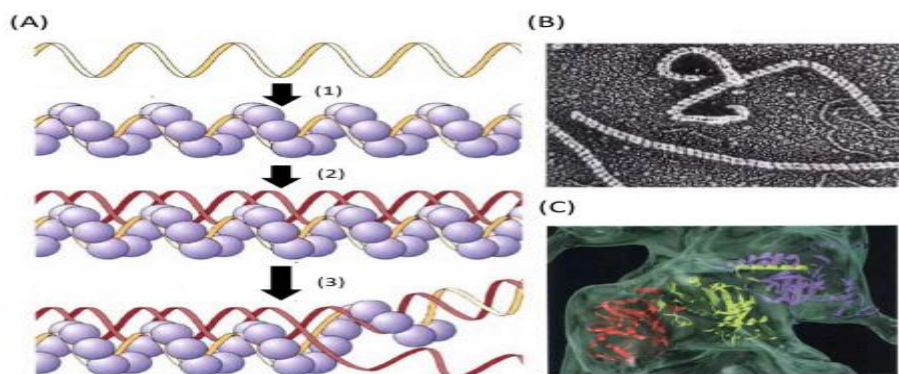


Figure 17. Protéines RecA dans la recombinaison homologue. Les protéines RecA forment un complexe au tour de l'ADN et procède à son intégration au niveau du génome. A) mécanisme de fonctionnement de la protéine RecA, B) observation en microscopie électronique des protéines RecA, C) structure 3D des protéines RecA.

3.9. Utilisation de la mutagenèse en amélioration des plantes

- **Exemples de mutations utilisées en amélioration des plantes**

Globalement, selon l'IAEA (*International Atomic Energy Agency*), plusieurs milliers de variétés de plantes (environ 3 220 en 2012) obtenues par mutagenèse sont commercialisées dans le monde. Parmi elles, 75 % sont des plantes de grande culture et 25 % des plantes ornementales (Ahloowalia et al, 2004 : IAEA, 2012) Environ les deux tiers ont été obtenus par les agents chimiques mutagènes. La mutagenèse est donc un outil qui est encore largement utilisé pour générer rapidement une variabilité génétique, là où la variabilité génétique spontanée n'apparaît pas très importante. Des exemples de mutations induites intéressantes, utilisées en amélioration des plantes sont cités dans le Tableau 2.

Les arbres fruitiers, comme toute plante à multiplication végétative, sont un matériel idéal pour la mutagenèse, puisqu'il est possible de reproduire facilement un mutant dès qu'il a été identifié.

Les nombreux mutants de pommier ainsi obtenus présentent des modifications concernant le port de l'arbre, la ramification, la fructification, la couleur du fruit (Cadic, 2012).

Tableau 2 : Exemples de mutations artificielles utilisées en amélioration des plantes (tableau établi en partie en partie à partir des données de Doré et Varoquau, 2006).

Espèce	Caractères et, éventuellement, variétés, pays d'utilisation et mode d'obtention
Plantes de grande culture	
Betterave	Stérilité mâle nucléo-cytoplasmique utilisée au Japon
Blé	Résistance aux herbicides imidazolinones (plus de 150 variétés dans le monde). Au Pakistan, une variété plus tolérante à la sécheresse. En chine, 700 000 ha cultivé avec des variétés portant des mutations induites.
Orge	Nanisme. Variété Baraka, Bétina (France). Rayons X
Riz	Forme et qualité du grain (Delta, Arlatan, Calendal en France), résistance à la verse (Allorio), résistance à la pyriculariose (Marathon). Rayons gamma (Cobalt 60)
Colza	Faible teneur en acide gras linoléique (Caddy), forte teneur en acide oléique (Cadoma), gène de nanisme Bzh utilisé au Canada, résistances à certains herbicides (imidazolinone et sulfonyles).
Fèverole	Précocité, résistance aux maladies, teneur en protéines
Lin	Faible teneurs en acide alpha-linolénique (Linola au Canada, obtenue par traitement au MSE)
Soja	Résistance aux maladies et précocité, en Inde Japon, Bangladesh
Tournesol	Teneur en acide oléique (nombreuses variétés), résistances aux imidazolinones, par MSE
Pois	Précocité et type de croissance, en Pologne.
Plantes légumières	
Chou	Stérilité mâle nucléaire, par traitement MSE, en Allemagne.
Chicorée/endive	Résistance au chlorsulfuron, variété Euréka.
Laitue	Essentiellement aux Etats-Unis, variétés naines Ice cube et Mini-green, résistance à la chaleur au Japon (Evergreen).
Pomme de terre	Couleur de la peau
Plantes fruitières	
Pamplemousse	Couleur rouge de la pulpe (Rubi red), absence de pépins (star, Rubi) au Brésil et en Argentine.
Pommier	Port de l'arbre (courtagol, Courtisol), aspect du fruit (absence de ressing, variété lysogolden, mutant de Golden delicious), Belrene (mutant de Reine des reinettes obtenu par EMS), courtavel (mutant à entre-nœuds courts issu de Starking delicious) en France, Autriche, Canada, Japon.
Poirier	Résistance à la maladie des taches noires, par rayonnement gamma
Cerisier	Allèles d'autofertilité (Stella)
Pécher	Calibre du fruit, rendement, par le rayonnement gamma, en Argentine et Bulgarie

Bananier	Précocité et taille de la plante
Plantes ornementales	
Weigelia	Feuillage panaché (Courtatom), par coblat 60 (rayons gamma)
Forsythia	Entre-nœuds plus courts (Courtaln), port de la plante (Courttasol), caractère « ovata » des fleurs par cobalt 60 (rayons gamma).

3.10. Place de la mutagenèse dans l'amélioration des plantes

La mutagenèse est le moyen de créer une nouvelle variabilité générique. Cela est particulièrement important lorsque la variabilité facilement disponible à l'intérieur d'une espèce est insuffisante. Elle est surtout intéressante pour des caractères à hérédité assez simple et pour des gènes à effets assez forts, peu affectés par le milieu. Elle a aussi été utilisée pour des caractères quantitatifs, polygéniques, sans que les gènes en cause soient identifiés, mais sans résultat évident. Pour les plantes à multiplication végétative difficiles à reproduire par voie sexuée (exemple du pommier et du poirier) la mutagenèse permet d'avoir rapidement de nouveaux caractères dans un fond génétique connu, de bonne valeur. Chez les espèces faciles à améliorer par voie sexuée, un allèle mutant peut être transféré par rétrocroisement directement dans un autre fond génétique, déjà amélioré, s'il n'y a pas de risque de modification d'autres caractères.

Si d'autres caractères sont affectés indirectement par la mutation (par exemple, les gènes de nanisme ou de précocité modifient de nombreux autres caractères) l'allèle mutant peut être transféré dans du matériel qui subira ensuite une sélection pour les différents caractères en cause. Ainsi le génotype peut être adapté à la mutation, par la sélection de gènes modificateurs supprimant les effets défavorables du gène sans supprimer l'effet bénéfique recherché. Dans ce but, chez les plantes allogames, la sélection récurrente au niveau de populations peut être une excellente méthode. Cependant, tout ce travail peut être très long et n'est envisageable que pour les plantes annuelles ou bisannuelles.

3.11. Vers une mutagenèse génique dirigée

Aujourd'hui, un autre type de mutagenèse induite est en cours de développement : il s'agit d'une mutagenèse contrôlée, permettant le changement de bases dans un gène déterminé à l'avance. Cela se réalise par l'isolement *in vitro* du gène, le changement de bases et la réinsertion du gène à la même place grâce à la maîtrise de la recombinaison homologue. Cette technique qui fait

appel à la transgénèse ciblée, pour la réinsertion du gène, est présentée sommairement dans ce qui suit (voir chapitre 3).

4. Interrogation de banques de données (recherche *in silico*)

En se basant sur l'outil de la bioinformatique : Le traitement bioinformatique des séquences biologiques peut être :

- **Simple** : composition de Tm, traduction, carte de restriction, recherche de cadres ouverts de lecture.
- **Complexe** : alignement, recherche d'amorce et optimisation des amorces, prédiction de structure secondaire et tertiaire, recherche de motifs, construction d'arbres phylogénétique. Cette dernière catégorie nécessite une connaissance des outils utilisés (Coutouly et al,2006).

Références bibliographiques

- Ahloowalia B.S. , Maluszynski M. , K. , Nichterlein . 2004. Global impact of mutation - derived varieties . *Euphytica* , 135 , 187-204 .
- Brahmachari, Goutam. 2017. Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications. First Edit. ed. Goutam Brahmachari. Academic Press.
- <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00048-X>.
- Braman, Jeff. 2010. In Vitro Mutagenesis Protocols. Third Edit. ed. Jeff Braman. Humana Press.
- Cadic A. 2012. Mutations , mutagenèse et amélioration des plantes . Colloque de l'Association française des biotechnologies végétales , 4 octobre 2012 , Paris.
- Coutouly, J. F., Deprez, P., Demonchaux, J., & Koruk, A. I. (2006). The Optimisation of Laser Welding and MIG/MAG--Laser Hybrid Welding of Thick Steel Sheets. *Lasers in Engineering (Old City Publishing)*, 16.
- Carmichael, Gordon. 2005. RNA Silencing Methods and Protocols. First Edit. ed. Gordon Carmichael. Humana Press.
- Doré C., Varoquaux F., 2006. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées, INRA Editions, Versailles. 812 p.
- Gallais, A.2013. De la domestication à la transgénèse. éditions Quea, paris 174 p.
- Fedor, Martha J. 2000. "Structure and Function of the Hairpin Ribozyme."
- Geoffrey M, Cooper, and Hausman Robert E. 2006. The Cell A Molecular Approach. Fouth. ASM Press.
- Lodish, Harvey et al. 2000. Molecular Cell Biology. 4th editio. Connected, Media.
- Meksem, Khalid, and Günter Kahl. 2010. The Handbook of Plant Mutation Screening: Mining of Natural and Induced Alleles. First Edit. eds. Khalid Meksem and Günter Kahl. Wiley Blackwell.
- Perazza D, cours génomique structurelle et fonctionnelle master 1. Université des frères Mentouri,2011.
- Sikora, Per et al. 2011. "Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional Genomics, and Breeding." International Journal of Plant Genomics 2011: 13. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/314829>.
- Turner, Philip C. 1997. Ribozyme Protocols. First edit. ed. Philip C. Turner. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0896033899>.
- Xu, Jian-zhong, and Wei-guo Zhang. 2016. "Strategies Used for Genetically Modifying Bacterial Genome: Ite-Directed Mutagenesis, Gene Inactivation, and Gene overExpression." J Zhejiang Univ Sci B 17(2): 83–99.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757579/>.



Chapitre 3 : Méthodes de transfert d'ADN

1. Principe de la transformation

La transformation en méthodologie moléculaire consiste à introduire une molécule d'ADN exogène ou endogène modifiée au sein d'une cellule eucaryote, d'une cellule procaryote ou même d'un tissu ou d'un organisme (Figure 18). Dans le cas d'un microorganisme ou d'un organisme la transformation aboutie à la création d'un organisme génétiquement modifié (OGM). Il existe plusieurs approches afin de réaliser une transformation, la technique employée dépend du type de cellule transformée.

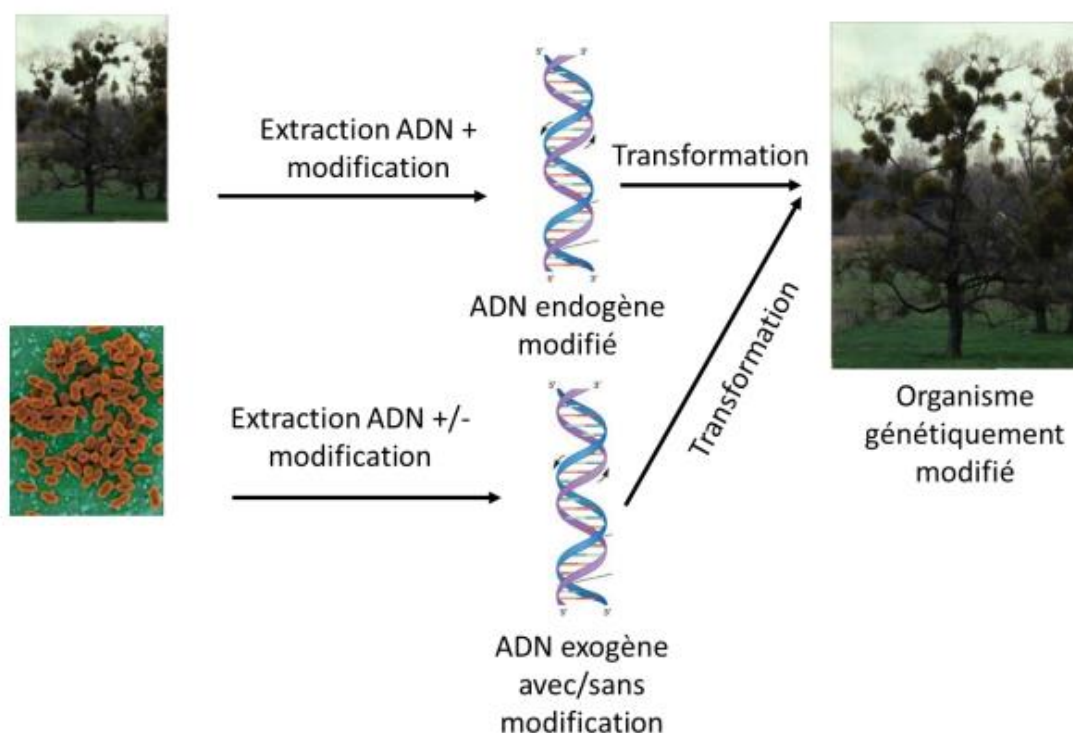


Figure 18. Principe de la transformation. L'ADN issu d'un organisme étranger ou de l'organisme étudié est modifié puis introduit par technique de transformation. Cela abouti à la création d'un OGM.

2. Le passage par la culture *in vitro*

La transformation a lieu *in vitro* au niveau d'un fragment d'organe (méristèmes embryons immatures...) ou de cellules isolées (protoplastes). Dans le premier cas, certaines cellules seront transformées, d'autres ne le seront pas : la plante qui sera régénérée sera donc chimérique, ce qui complique un peu l'obtention de la plante transformée. Avec la transformation de cellules isolées, toutes les cellules de la plante régénérée à partir d'une cellule transformée porteront le transgène. Le passage obligatoire par une étape de culture *in vitro* conduit à réserver le transfert des gènes par transgénèse aux génotypes d'une espèce qui régénèrent facilement une plante à

partir d'une cellule ou d'un fragment de tissu . Cette étape est encore aujourd'hui le facteur le plus limitant à une utilisation généralisée de la transgénèse pour le transfert de gènes. Ainsi, chez le maïs, ce sont des lignées ayant une bonne aptitude à la culture *in vitro* qui sont transformées puis ces lignées servent de parent donneur pour transférer le transgène, par rétrocroisement assisté par marqueurs, à des lignées n'ayant pas l'aptitude à la culture *in vitro*.

3. Méthodes de transformation

Jusqu'à aujourd'hui, le transfert des gènes se réalisait uniquement de façon non ciblée, soit indirectement, par l'intermédiaire d'une bactérie, soit directement, par biolistique.

3.1. Transfert non ciblé d'un gène

➤ Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie qui provoque la galle du collet sur différentes espèces végétales. Elle a la propriété remarquable de transférer une partie de son ADN, portée par un plasmide, dans le génome nucléaire de la cellule végétale, pour asservir cette dernière à ses besoins (en lui faisant produire des opines, substrats aminocarbonés que seule la bactérie peut cataboliser). Le transfert demande des fonctions de reconnaissance et de virulence (phénomène encore mal connu).

Elle vie à l'état épiphyte sur les végétaux, dans le cas d'une blessure, l'activation des gènes de virulence Vir à lieu suite à la perception du signal de dommage. La virulence de cette bactérie est déterminée par la présence d'un plasmide portant les gènes de virulences, le plasmide Ti (Tumor induce). Ce dernier présente deux régions, la première est nommée ADNT, elle est située entre deux séquences flanquantes nommées bordures droite et gauche. Elle comporte les gènes oncogènes (de biosynthèse d'auxine et de cytokinine) et le gène de biosynthèse des opines qui sont des composés polycarbonnés utilisés pour la croissance de la bactérie. L'ADNT est transférée au cours du processus d'infection de la bactérie vers la cellule hôte. La deuxième région du plasmide comporte les gènes de virulences ou gènes Vir responsable de la production et du transfert de l'ADNT ainsi que du gène de dégradation des opines (Figure 19).

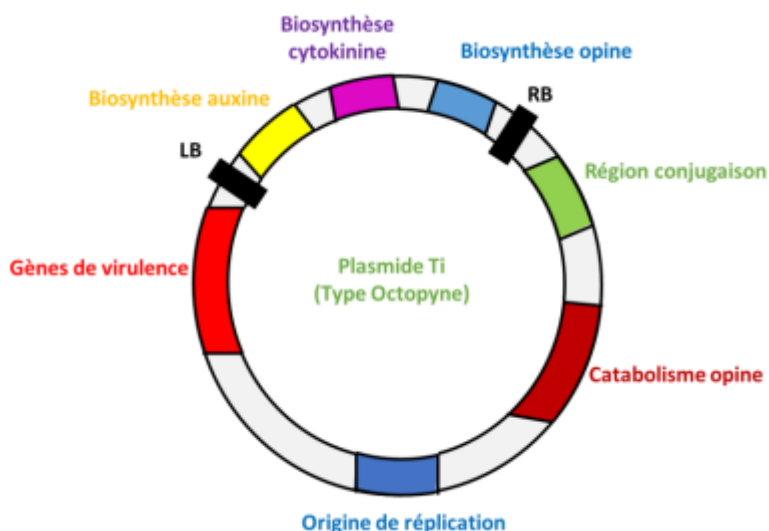


Figure 19. Schémas du prototype du plasmide Ti. Le plasmide Ti comporte une origine de répllication, un gène de catabolisme d'opine, une région contenant les gènes de virulence et un ADNT situé entre les bordures droite et gauche. Cette partie du plasmide contient des de biosynthèse d'auxines, de cytokinine et d'opine.

Lors du processus infectieux, les protéines Vir codées par le plasmide de virulence Ti active la répllication de l'ADNT qui contient des gènes oncogènes (de biosynthèse d'auxine et de cytokinine) ainsi qu'un gène de biosynthèse d'opine (molécule poly-carbonées utilisée comme source d'énergie).

L'ADNT répliqué est ensuite transféré au sein du noyau des cellules de la plante toujours sous l'action des protéines Vir, au sein du génome de la plante, l'ADNT est intégré par recombinaison hétérologue et les gènes sont induits ce qui conduit à une stimulation de la division des cellules de l'hôte et à la formation d'une tumeur. Cette dernière libère des opines utilisés pour la croissance d'*A. tumefascience* (Figure 20).

L'agro transformation consiste à utiliser *A. tumefascience* comme agent de transformation. Un plasmide de virulence Ti atténué (ou désarmé) est employé, au sein duquel l'ADNT a été remplacés par le transgène. Le plasmide de virulence atténué est ensuite transféré au sein de la bactérie.

La transformation des cellules végétale est réalisée par l'incubation de cellules de plante en présence de la bactérie ou le traitement d'un organe telle que les fleurs. Les cellules ou individus transformés sont sélectionnées par l'expression d'un gène de résistance à un herbicide codé par le transgène.

Pour réaliser une transgénèse artificielle, on exploite l'aptitude au transfert d'ADN de la bactérie. On utilise pour cela des plasmides désarmés, c'est à dire ayant perdu leur pouvoir d'induire une tumeur. À la place de l'ADN que la bactérie transfère normalement, on insère le gène à transférer. Ainsi, quand elle est cultivée avec un fragment d'organe ou des cellules végétales isolées, la bactérie va transférer ce gène et l'intégrer dans le génome de la plante. Une seule insertion est en général réalisée (quelquefois deux ou trois).

Dans les premiers travaux sur la transgénèse le transfert par *Agrobacterium* n'était efficace que pour les dicotylédones ; la seule limite était la possibilité de régénération d'une plante à partir de la culture *in vitro* de fragments d'organes. Des espèces comme les monocotylédones, en particulier les graminées, étaient insensibles à l'infection par *Agrobacterium* et ne pouvaient pas être transformées par cette voie. Mais, grâce à la transgénèse, la modification du génome d'*Agrobacterium* (par surexpression de certains gènes de virulence), permet maintenant d'utiliser ce vecteur chez pratiquement toutes les espèces végétales.

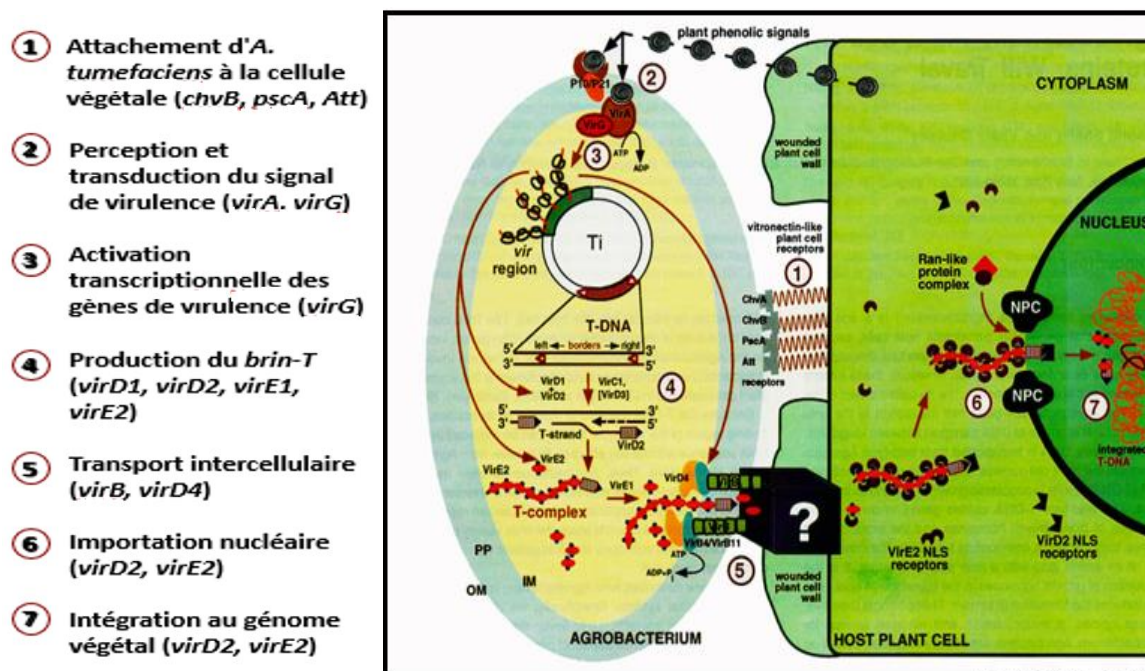


Figure 20. Mécanisme d'infection par ADNT d'*A. tumefaciens*. Après la perception de signaux extracellulaire (1) *A. tumefaciens* exprime les gènes de virulence ou Vir (2). Les protéines Vir (3) réplique l'ADNT (4) et le transfert vers la cellule végétale (5), puis vers le noyau (6) au sein duquel les gènes contenus dans l'ADNT sont exprimés.

3.2. Transfert direct

➤ Biolistique

La méthode la plus utilisée est celle de la biolistique dans le domaine végétal. Des microbilles de tungstène ou d'or sont enrobées d'ADN (gène à transférer) : projetées à grande vitesse à travers la paroi des tissus végétaux, certaines d'entre elles pénètrent dans le noyau. Les cellules transformées sont sélectionnées via la résistance à un herbicide porté par une partie du transgène. Par régénération *in vitro*, des plantes OGMs régénérées à partir des cellules transformées sont produites (Figure 21). Cette méthode a l'inconvénient d'introduire plus de copies du transgène que la méthode utilisant *Agrobacterium*. La présence d'une seule copie facilite en effet le transfert du transgène de la lignée transformée vers un génotype élite par la méthode des rétrocroisements ; de plus la transformation peut être définie de façon plus précise.

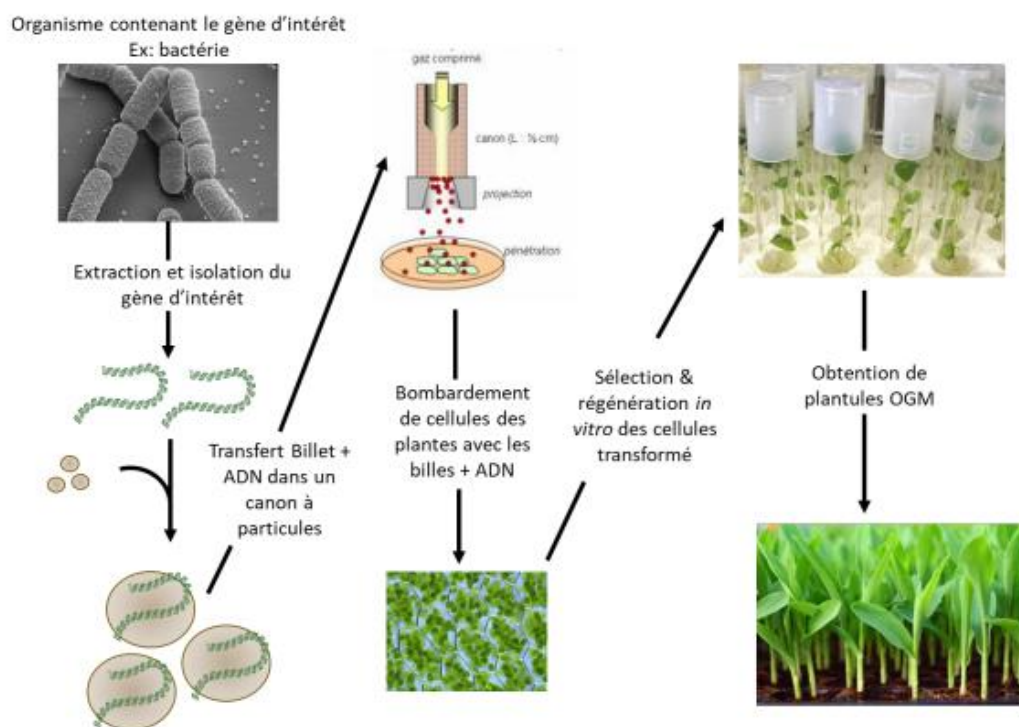


Figure 21. La transformation par biolistique. Les gènes issus d'un organisme telle qu'une bactérie sont extraits puis fixés sur des microbilles, qui sont propulsées par un canon à particule sur des cellules. Une sélection des cellules ayant intégrées l'ADN est sélectionnée puis des plantes sont régénérées à partir de ces cellules.

4. Autres techniques de transformation

Il existe plusieurs techniques permettant la transfère d'un ADN dans une cellule ou un organisme.

4.1. Transformation par choc physique

La transformation par choque physique est couramment utilisée en recherche afin de transformer des cellules procaryotes, telle qu'au cours de l'introduction d'un plasmide au sein d'une bactérie. Le choc thermique et le choc électrique sont deux types de transformation par choc physique.

4.2. Transformation par choc thermique

La transformation par choc thermique peut être utilisée sur des bactéries thermocompétantes (qui sont capables de supporter les variations de températures exercées). Les bactéries sont incubées avec l'ADN en présence de CaCl_2 quelque minute à faible température (4°C), puis transférées rapidement à une température élevée (42°C) ce qui aboutit à la formation de nanopores par le CaCl_2 dans l'enveloppe bactérienne. L'ADN traverse la cellule via les pores formés (Figure 22).

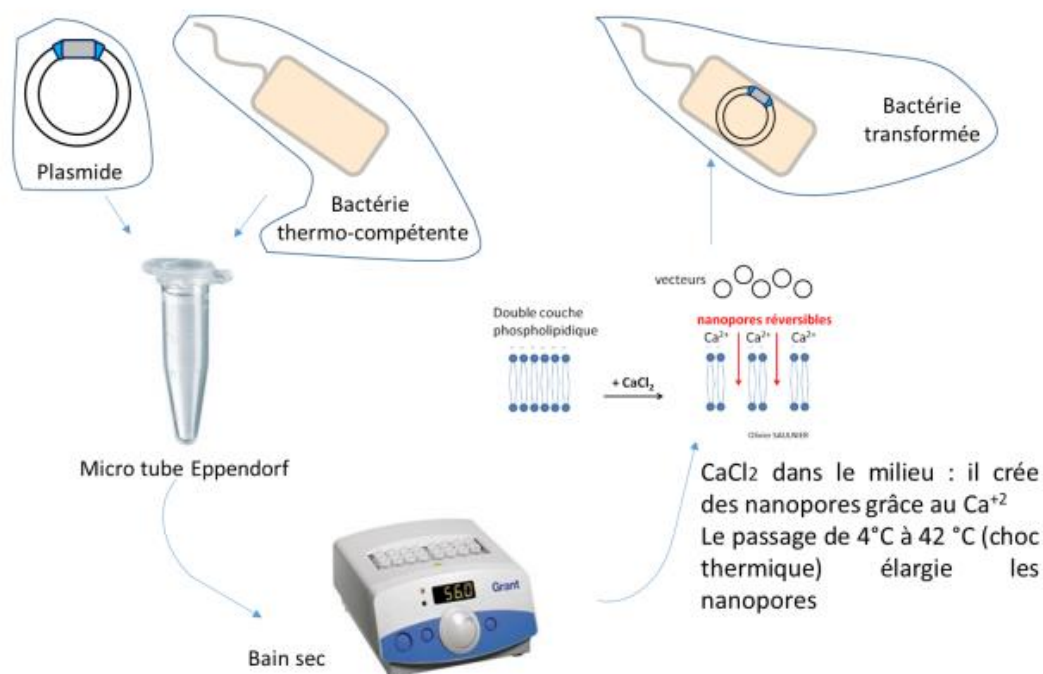


Figure 22. La transformation par choc thermique. Le plasmide et les bactéries sont soumis à un choc thermique en présence de CaCl_2 . Cela provoque des pores au niveau des membranes par lesquels le plasmide pénètre dans la cellule.

4.3. Transformation par choc électrique

La transformation par choc électrique ou électroporation consiste à mettre les cellules électrocompétantes (incluses dans un milieu dépourvu de sels) avec l'ADN dans une cuve d'électroporation. Suite à cela la cuve est placée dans un générateur électrique (électroporateur) dans lequel la suspension est soumise à un choc électrique qui provoque la formation de pores au sein de l'enveloppe bactérienne par lesquels passe l'ADN (Figure 23).

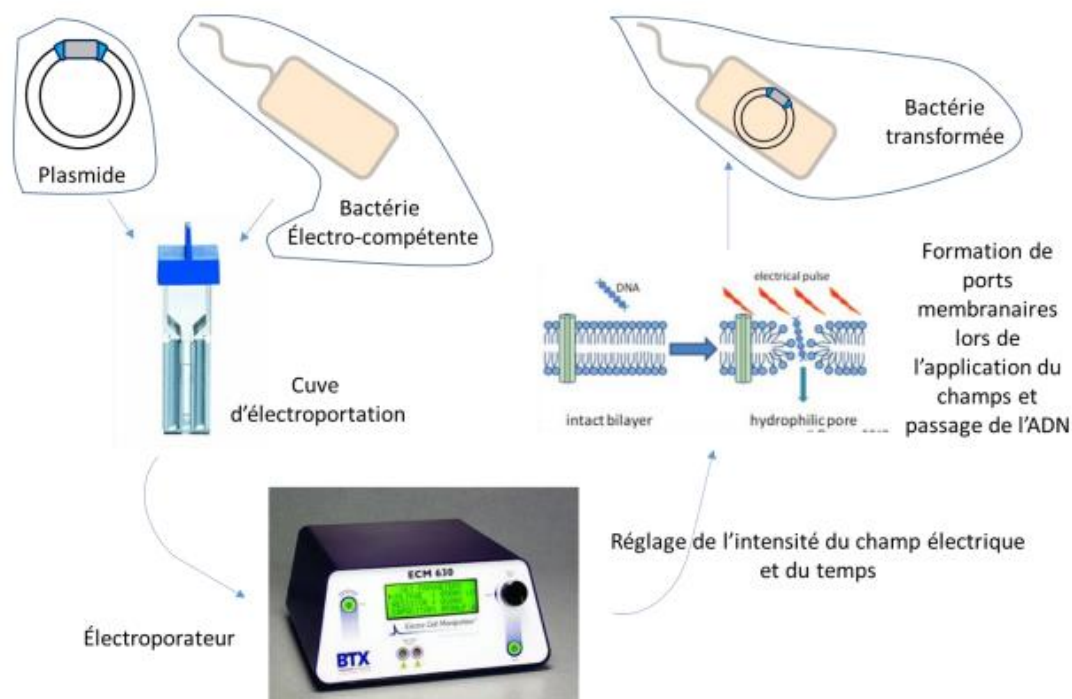


Figure 23. Principe de l'électroporation. Les cellules et l'ADN à transférer sont soumis à un choc électrique qui provoque la formation de pores par lesquels l'ADN traverse.

4.4. Transformation chimique

La transformation chimique consiste à transférer de l'ADN dans une cellule par l'ajout d'agents chimique. La transformation des levures par lithium acétate est un exemple de transformation chimique. Elle consiste à incuber des levures en présence de lithium acétate, de Polyéthylène glycol (PEG) ainsi que d'un ADN entraîneur (exemple ADN de sperme de saumon), en plus de l'ADN à transférer.

La suspension est incubée à 30°C, puis transférée à 42°C et enfin 30°C. Le lithium acétate sous l'effet du changement de températures provoque la formation de pores au sein de l'enveloppe, le PEG permet de lier l'ADN aux parois de la cellule et de générer un choqe osmotique permettant la pénétration de l'ADN par l'ADN entraîneur (Figure 24).

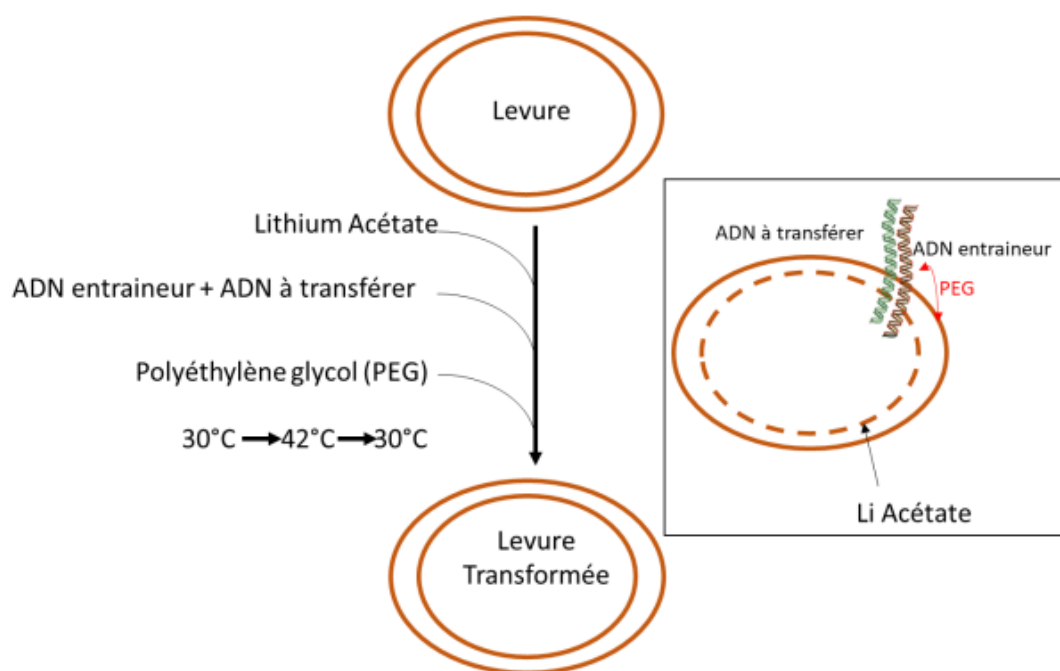


Figure 24. Transformation chimique de levure par lithium acétate. Les levures sont soumises à un choc thermique de 42°C en présence de lithium acétate qui perméabilise la membrane plasmique, du PEG qui fixe l'ADN à la paroi et de l'ADN entraîneur qui entraîne l'ADN dans la cellule.

4.5. Micro injection

La microinjection consiste à introduire de l'ADN directement dans une cellule par injection, elle est utilisée dans la transformation de cellules animales. Ces dernières sont figées par un micromanipulateur et un micro-injecteur injecte l'ADN au sein de la cellule. La transformation de cellules sexuelles est privilégiée car elle permet d'exprimer le transgène chez l'animal entier.

5. Transfert ciblé d'un gène

Le transfert ciblé correspond à l'insertion du transgène en un site précis du génome déterminé à l'avance. Ce progrès dans la technique de transgénèse n'a été possible que par la découverte d'enzymes de type endonucléases, les méganucléases, et par la construction d'endonucléases artificielles, nucléases à doigt de zinc et TALENs, chez lesquelles un domaine ayant une activité nucléase est associé à un domaine de reconnaissance de séquences d'ADN. On peut regrouper sous le sigle SDN (pour Site Directed Nucleases) ces différentes protéines, naturelles ou artificielles. Ces SDN ont la propriété de reconnaître une séquence d'ADN de 14 -18 paires de bases, de part et d'autre du point où ils induisent une coupure des deux brins de la chaîne d'ADN, point qui par conséquent a toute chance d'être unique dans un génome. Au cours du processus de réparation, une séquence d'ADN peut s'insérer. L'unicité de la coupure va favoriser la recombinaison homologue. c'est - à - dire la recombinaison entre deux séquences d'ADN

identiques affectant les deux brins d'ADN de part et d'autre du même site (Quétier, 2011). L'insertion d'un gène dans la chaîne d'ADN en un site de coupure précis nécessite une double recombinaison homologue grâce à la présence de chaque côté de ce site de séquences d'ADN (de 100 à 5 000 paires de bases) identiques à celles situées aux deux extrémités du gène à insérer. Cette recombinaison est favorisée par la spécificité du site d'insertion créé par la protéine SDN. Il faut donc introduire dans la cellule, en plus de la construction transgénique (transgène et ses deux séquences bordantes), un plasmide d'expression transitoire portant une séquence d'ADN codant pour la protéine SDN spécifique du site. L'introduction de l'ensemble peut se faire par transfert direct, soit sur des cals embryogènes, par biolistique, soit par électroporation de protoplastes. Cette technique est maintenant maîtrisée chez différentes espèces végétales.

Le gène inséré peut être un nouveau gène, n'ayant pas de locus correspondant dans le génome receveur (par exemple, un gène de résistance aux insectes), mais il peut aussi s'agir d'un gène du génome receveur, qui a été extrait *in vitro* et modifié dans sa séquence des bases, ce qui revient à créer un allèle nouveau par mutation. Ce nouvel allèle est alors réintroduit, avec une grande précision, au locus d'origine de l'allèle modifié : c'est la mutagenèse dirigée. Il s'agit d'une véritable substitution d'allèles. Ce mécanisme ne laisse aucune trace moléculaire : le transfert ainsi réalisé ne peut pas être distingué d'une mutation naturelle. Cette technique est donc appelée à se substituer aux programmes de rétrocroisement, qui ont pour but de remplacer un allèle défavorable par un allèle favorable, à condition que la régénération *in vitro* de plantes à partir de cellules soit maîtrisée. Elle permet de supprimer le problème de linkage drag propre à ce type de programme : seul l'allèle désiré est introduit.

6. Détection des plantes transformées

Pour la détection des cellules ou des plantes transformées, quelle que soit la méthode de transfert, il faut un marqueur, appelé marqueur de sélection, introduit en même temps que le gène d'intérêt. Dans les premiers événements de transformation génétique, ce marqueur était lié au transgène : ce n'est plus le cas aujourd'hui, ce qui facilite son élimination ultérieure. Les marqueurs classiquement utilisés sont la résistance à un antibiotique, la kanamycine ou l'hygromycine et la résistance à un herbicide (le glyphosate, par exemple). Après action *in vitro* de ces substances seules les cellules transformées, ayant donc acquis la résistance se multiplient et on ne régénère donc que des plantes porteuses du transgène. Ces plantes sont autofécondées pour fixer le transgène à l'état homozygote. Le marqueur de sélection peut être éliminé, par différentes méthodes qui ne seront pas développées. Aujourd'hui, les événements de

transformation génétique portant comme marqueur de sélection un gène de résistance aux antibiotiques ne sont plus acceptés par l'Union européenne. Le résultat de la transformation génétique est alors un transgène bien défini, inséré dans un site précis du génome (par exemple, les événements Mon 810, NK 603. Cela définit un événement de transformation génétique. Cet événement est ensuite introduit par rétrocroisements dans les variétés qui sont commercialisées. Il ne faut donc pas confondre les événements de transformation génétique et les variétés transgéniques qui portent le même événement. Avec la transgénèse ciblée, un transgène pourra être introduit directement dans une lignée élite, si celle-ci se prête à la régénération *in vitro* et si le caractère pour lequel il code n'affecte pas les autres caractères de cette lignée.

7. Site d'insertion et expression du gène

➤ Cas de la transgénèse non ciblée

Avec la transgénèse non ciblée, le processus d'intégration d'un transgène est encore mal connu. On sait que l'intégration n'est pas complètement aléatoire. Selon le site d'insertion, le gène peut ne pas s'exprimer de la même façon. Pour limiter ce risque, aujourd'hui, grâce au séquençage du génome de certaines espèces, on choisit les événements de transformation génétique correspondant à des insertions dans des zones pauvres en gènes, ce qui revient à contrôler en partie le site d'insertion. Y a-t-il des risques de modification du fonctionnement du génome, en dehors des modifications causées par l'expression du transgène ? S'il n'est pas toujours possible de prévoir comment un gène va fonctionner dans un génome, la transgénèse ne conduit pas pour autant à la production de plantes anormales. Un maïs transgénique reste un maïs. Cependant, le gène introduit peut modifier plus qu'attendu certains caractères. Il faut donc bien étudier ces effets avant d'envisager l'utilisation d'un transgène. De ce point de vue, la transgénèse, même non ciblée, est une source de variation génétique équivalente à la mutagenèse et il faut donc étudier les caractères des plantes transgéniques, pour ne retenir que les événements conduisant à des modifications favorables. C'est ce que font les généticiens et sélectionneurs qui font appel à cette technique. Ainsi, un événement de transformation génétique retenu est en général passé au travers de plusieurs filtres ou années de sélection. Cette période d'évaluation des événements permet aussi de ne retenir que ceux qui sont stables. Pour résoudre les problèmes d'insertion et mettre tous les transgènes sur un même support, un chromosome artificiel peut être envisagé (Yu et al., 2007). Un tel chromosome serait manipulé *in vitro* et introduit dans la plante. À la différence des animaux, les végétaux, dans leur grande majorité, supportent en effet assez bien la présence de chromosomes surnuméraires. Une telle

approche peut simplifier les études d'impact possible de l'insertion des transgènes sur le fonctionnement du génome. Des travaux sont actuellement en cours chez le colza.

➤ **Cas de la transgénèse ciblée**

Les problèmes d'insertion sont aujourd'hui pratiquement résolus par la maîtrise de la recombinaison homologue. Il est en effet possible d'insérer, en n'importe quel point, n'importe quel gène plus ou moins modifié : il suffit de l'encadrer par les séquences bordantes du site d'insertion. Le lieu d'insertion peut donc être choisi a priori d'insertions : en effet, le gène, avec les séquences bordantes choisies, ne peut être introduit qu'en un seul exemplaire dans le génome.

Références bibliographiques

- Eynard, Nathalie, and Justin Teissié. 2000. Electrotransformation. Springer Berlin Heidelberg.
- Gallais, A. 2013. De la domestication à la transgénèse. éditions Quea, paris 174 p.
- Gietz, R. Daniel, and Robin A. Woods. 2018. "Genetic Transformation of Yeast." BIOTECHNIQUES 30(4). <https://doi.org/10.2144/01304rv02>.
- Johnston, S. A. 1990. "Biolistic Transformation: Microbes to Mice." Nature 346(6286): 776– 77.
- Perazza D, cours génomique structurelle et fonctionnelle master 1. Université des frères Mentouri, 2011.
- Wang, Kan. 2015. Agrobacterium Protocols. ed. Kan Wang. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1658-0>.



Chapitre 4 : Les stratégies pour la modification de l'expression génique

1. La régulation génétique

La régulation génétique est un moyen pour la cellule de développer des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des protéines inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires.

Les gènes codant ces protéines sont appelés les gènes régulateurs. Il y a deux types de protéines régulatrices :

- 1- **Les activateurs**=> d'une façon positive : l'interaction déclenche la transcription du gène
- 2- **Les répresseurs**=> d'une façon négative : l'interaction empêche la transcription du gène

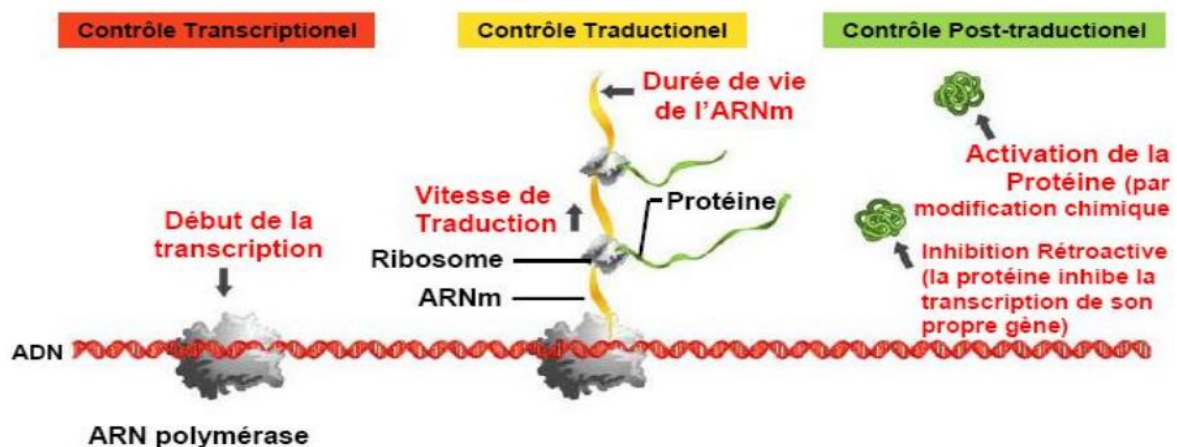


Figure 25. La régulation génétique

2. Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription

Deux modes distincts de contrôle de l'initiation de la transcription : un contrôle constitutif qui dépend de la structure du promoteur et un contrôle de régulation qui est sous la dépendance de protéines régulatrices.

❖ Quelques définitions

- **Facteur de transcription** : protéine de régulation transcriptionnelle.
- **Activateur** : protéine qui stimule l'initiation de la transcription et favorise l'expression d'un gène.
- **Répresseur** : protéine qui inhibe la transcription et empêche l'expression d'un gène.
- **Opérateur** : site cible de la protéine répresseur (souvent proche du site d'initiation de la transcription)

- **Gène de structure** : code une protéine structurale, une enzyme ou une protéine régulatrice.
- **Gène de régulation** : code une protéine impliquée dans la régulation d'expression d'autre gène.
- **Trans** : Les facteurs trans jouent un rôle important surtout chez les eucaryotes où ils activent et régulent la transcription en modulant l'efficacité de la lecture du gène par l'ARN polymérase II.
- **Cis** : pour toute séquence d'ADN non transformée en une autre molécule, elle agit in situ et touche l'ADN auquel elle est liée (promoteur et opérateur)
- **Opéron** : Un opéron est un ensemble de gènes ayant vocation à fonctionner de manière coordonnée de façon à produire les protéines répondant à une voie physiologique bien intégrée, ainsi qu'à apporter les mécanismes de régulation de cette voie (Figure 26).

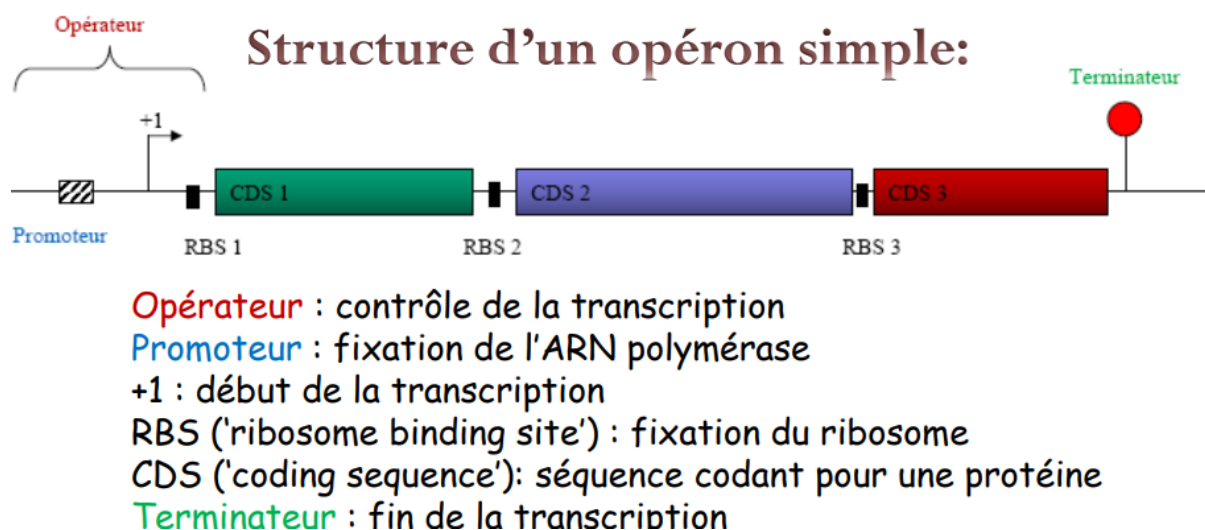


Figure 26. La structure d'un opéron simple

3. Exemple d'un opéron inducteur : L'opéron lactose de la bactérie *Escherichia coli*

Avec l'étude de l'opéron lactose, François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff ont été les premiers scientifiques à décrire un système de régulation de la transcription des gènes. Ils proposent l'existence de deux classes de gènes qu'ils différencient par leur fonction : les gènes structuraux et les gènes régulateurs. C'est à partir de ces travaux qu'est né le concept de la régulation génique. (Prix Nobel de physiologie et médecine en 1965)

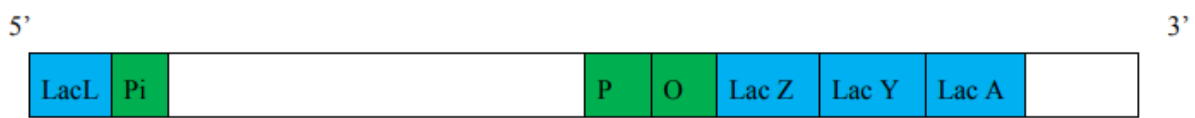
3.1. Organisation de l'opéron lactose

L'opéron lactose comprend :

- **Le gène LacI** en 5' (gène régulateur I) possédant son propre promoteur(Pi) code pour une protéine appelée répresseur I.
- **Trois gènes structuraux** : LacZ , LacY, LacA.
- **Le gène lacZ** (code pour La β -galactosidase) : qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose
- **Le gène lacY** (code pour La lactose perméase) : Cette protéine membranaire permet l'entrée du lactose dans la cellule.
- **Le gène lacA** (code pour la thiogalactoside transacétylase) : rôle inconnu de l'acétylation

Une région régulatrice de ces trois gènes comprend le promoteur (p) et l'opérateur (o). Le promoteur de ces trois gènes possède :

- En amont : un site CAP fixant une protéine CAP activée par l'AMPc : la fixation induit l'activation du promoteur et donc la transcription des gènes de structure.
- En aval : un opérateur, qui est une séquence d'ADN sur laquelle se fixe des protéines régulatrices permettant la régulation transcriptionnelle de l'opéron



La bactérie trouve sa source de carbone dans le catabolisme des sucres. Si le glucose est la source de carbone "préférée", le lactose peut également être consommé par la bactérie et métabolisé en galactose et glucose. Les enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose ne seront synthétisées qu'en présence de ce substrat.

3.2. Fonctionnement d'un opéron d'*Escherichia coli*

3.2.1. En présence de glucose et absence de lactose

Lorsque la bactérie se trouve dans un milieu dépourvu de lactose le gène LacI est transcrit ensuite traduit ce qui va entraîner la synthèse du REPRESSEUR monomérique de la protéine (Figure 27) qui s'assemble pour former un complexe tétraédrique (04 sous unités identiques) Ce complexe va se fixer sur l'opérateur empêchant l'avancé de transcription de l'ARN polymérase (fixe sur l'opérateur) Par conséquence : Pas d'expression des enzymes charges de métabolisme du lactose (la bactérie utilise que le glucose)

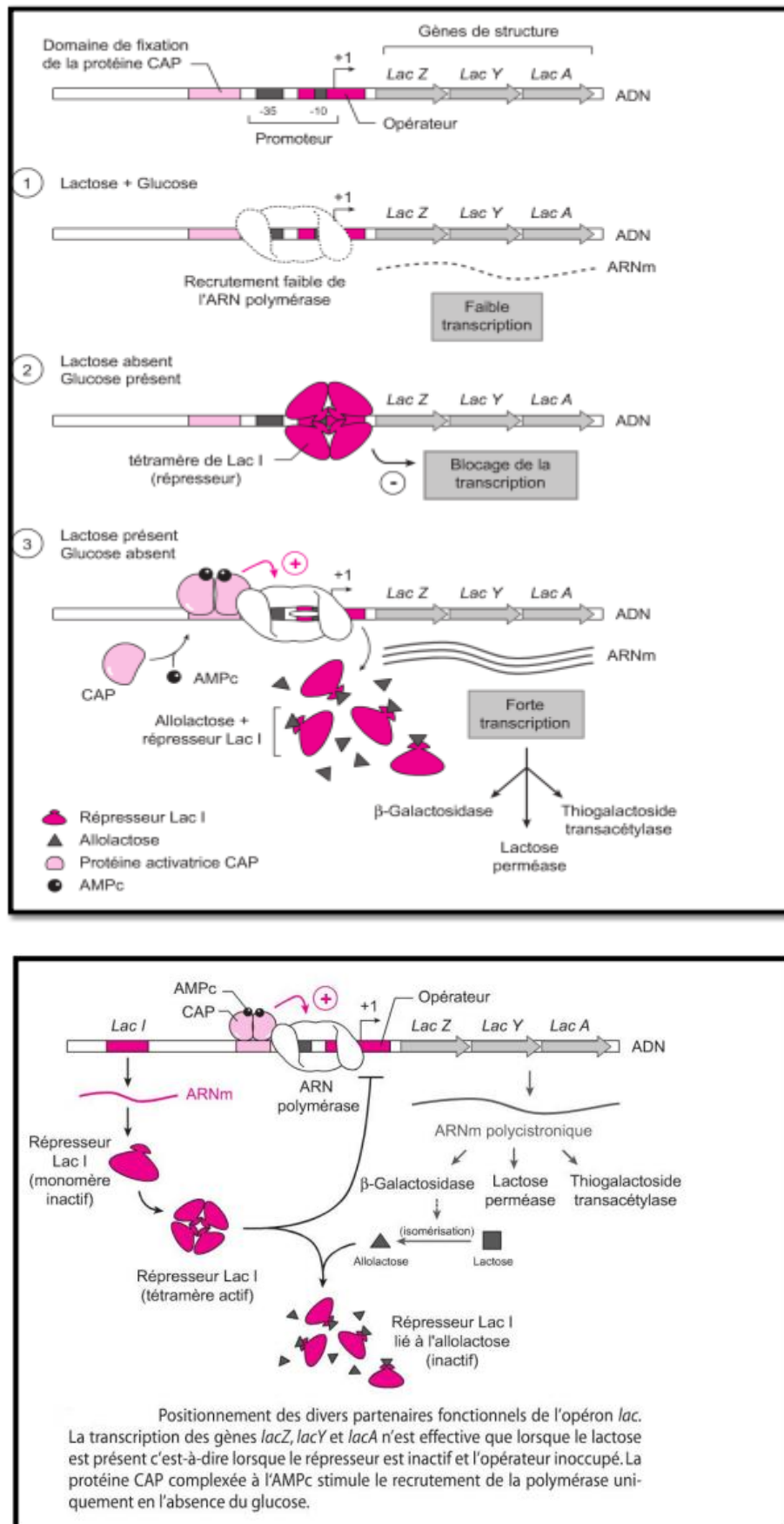


Figure 27. Fonctionnement d'un opéron d'*Escherichia coli*.

3.2.2. En présence de lactose et absence de lactose

Grace à la perméase (une petite quantité présente dans la cellule), le lactose pénètre dans la cellule et va être transformé en allolactose qui possède une affinité pour le répresseur. L'allolactose se fixe sur un site spécifique localisé sur le répresseur tetramérique s'accompagnant d'une modification de la conformation du répresseur et son détachement, alors il ne pourra plus se fixer sur l'opérateur et donc permettant à l'ARN polymérase de progresser et d'entamer la transcription et par la suite la production des enzymes chargées de métabolisme du lactose. Donc : Le lactose agit comme inducteur des enzymes chargées de son métabolisme (Figure 28). Remarque : L'absence du glucose induit l'accumulation de l'AMP cyclique qui va entraîner la fixation du complexe CAP-AMPc au niveau du promoteur.

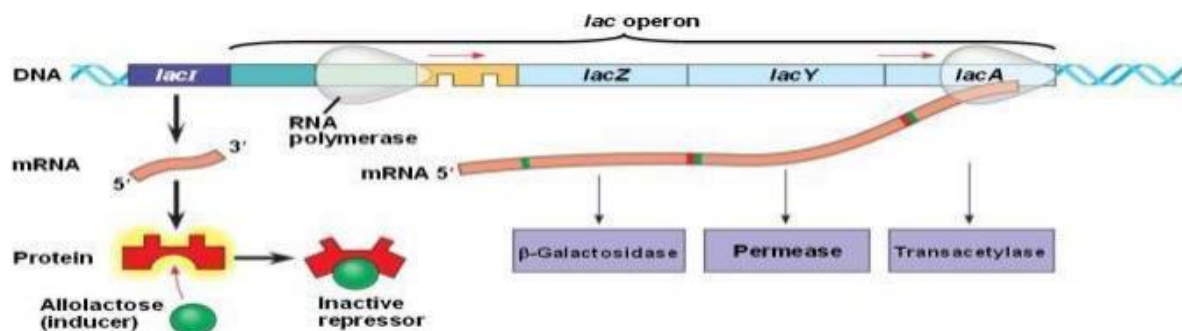


Figure 28. Opéron lac Z en présence de lactose et absence de lactose

3.2.3. En présence de glucose et de lactose

Dans ce cas la bactérie utilise préférentiellement le glucose. L'augmentation de taux de glucose va entraîner la diminution de concentration de l'AMPc donc pas de fixation de l'AMPc à la protéine CAP et par la suite pas de fixation de l'ARN polymérase donc pas d'expression de l'opéron lactose. Après l'épuisement du glucose, la bactérie se trouve privée d'une source d'énergie, elle accumule l'AMPc. Qui va se lier à la protéine CAP formant le complexe CAP-AMPc qui va se fixer sur le promoteur permettant ainsi la transcription de l'ARN polymérase et la production des enzymes chargées (l'allolactose est fixé sur le répresseur exprimé par le gène LacI) (Figure 29). Donc : *le complexe CAP-AMPc est un régulateur positif *le répresseur est un régulateur négatif.

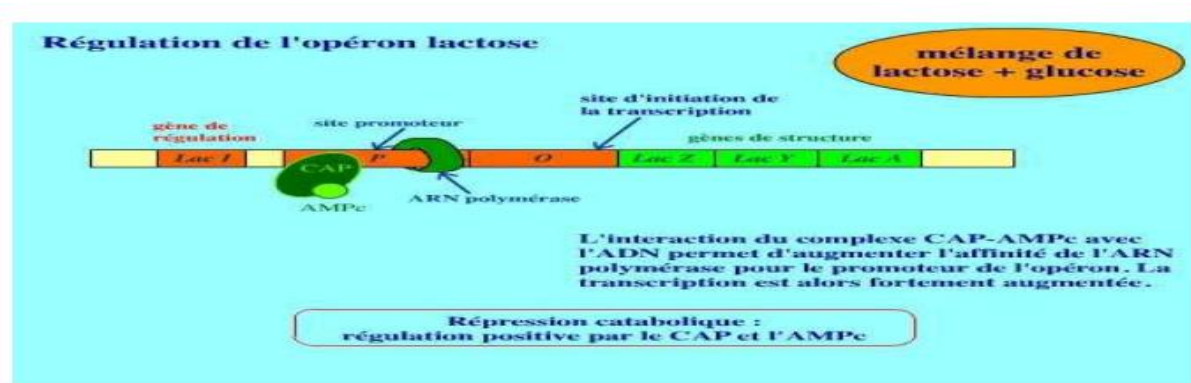


Figure 29. Opéron lac Z en présence de glucose et de lactose

4. Visualisation de l'expression génique des transgènes

L'expression d'un transgène dépend de la présence d'un **promoteur** choisi pour permettre sa **transcription** afin de répondre aux tâches voulues comme :

- 1/ Synthèse plus ou moins accentuée d'une protéine,
- 2/ Expression exclusive voulue au niveau d'un organe précis de la plante (feuille, racine, graines...)
- 3/ Expression lorsque des conditions environnementales précises (présence de parasites, température, ...) sont réunies. Ce sont des régulations spatio-temporelles strictes.

4.1. Le promoteur

Un **promoteur**, ou **séquence promotrice**, est une région de l'ADN située à proximité d'un gène et est indispensable à la transcription de l'ADN en ARN. Le promoteur est la zone de l'ADN sur laquelle se fixe initialement l'ARN polymérase, avant de démarrer la synthèse de l'ARN. Les séquences promotrices sont en général situées en amont du site de démarrage de la transcription. La fixation et l'activation de l'ARN polymérase sont contrôlées par des facteurs de transcription (éléments trans-régulateurs) qui se fixent au niveau de séquences cis-régulatrices spécifiques classiquement appelées "enhancer" et "silencer", situées à des distances variables du site de démarrage de la transcription. Les facteurs de transcription peuvent être soit des activateurs, soit des répresseurs de la transcription.

Les gènes rapporteurs doivent obéir à trois conditions :

1. être étranger au génome de l'organisme modifié afin que leur produit n'intervienne pas dans le métabolisme.

2. leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise afin de déterminer dans quel tissu agit le gène modifié (précipitation du produit dans son site de production exemple transformation du X-glu par l'enzyme GUS donnant un produit bleu dans le site).
3. leur produit doit être quantifiable afin de mesurer l'activité du promoteur induisant la modification.

4.2. Gène rapporteur

Un gène rapporteur est un gène témoin, un marqueur codant pour une protéine d'activité connue et détectable, il est utilisé pour étudier l'activité d'un autre gène. Ainsi le gène rapporteur est rajouté à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite. Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes codant des protéines fluorescentes ou des enzymes dont l'action provoquera l'apparition d'un produit coloré.

-Exemple de protéines fluorescentes : la protéine fluorescente verte (GFP), et la luciférase qui émet une lumière jaune.

-Exemple de protéine à activité enzymatique : le gène GUS, codant une enzyme (la bêta-glucuronidase) qui colore en bleu les cellules où il est actif, mais il est létal. Le gène lac Z codant la β -galactosidase (Lac Z) qui métabolise le X-gal fait apparaître une coloration bleue.

4.2.1. Gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein) de la méduse

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine issue d'une méduse *Aequorea victoria*, capable d'émettre une fluorescence verte après excitation par une lumière bleue (Figure 30).

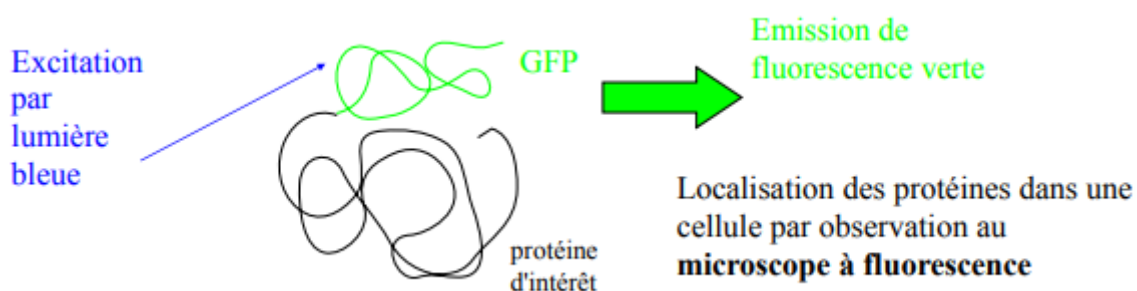


Figure 30. La GFP (Green Fluorescent Protein).

4.2.2. Le gène Gus

Le gène GUS, isolé d'*Escherichia coli*, code pour l'enzyme de la bêta-glucuronidase capable d'hydrolyser certains composés glucuroniques. Cette enzyme, en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit (précipité insoluble) de couleur bleue (Figure 31). Quand ce gène rapporteur est fusionné avec le promoteur d'un gène d'intérêt, cette technique permet de visualiser ses territoires d'activité.

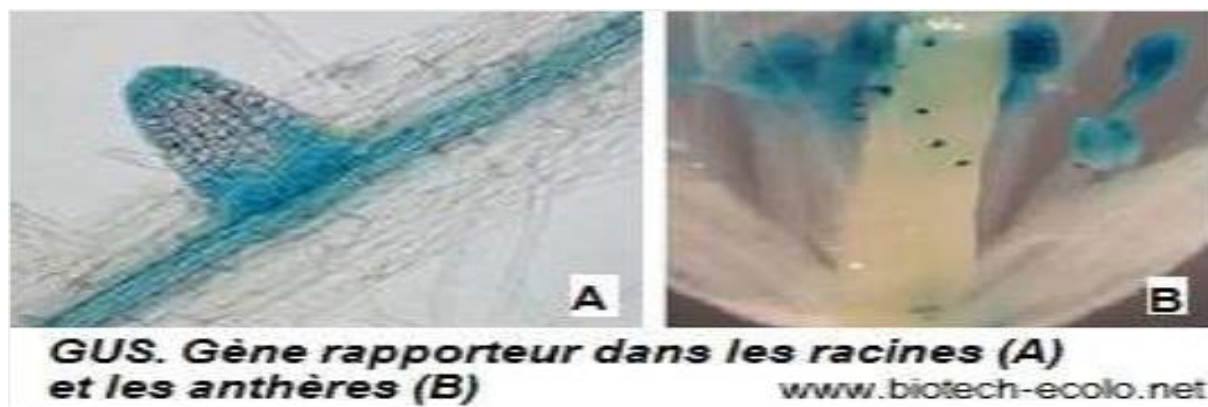


Figure 31. Le gène Gus

4.2.3. Le gène lac z

Dans certain cas et pour des raisons diverses, les clones issus de la transformation par le vecteur recombiné contiennent un vecteur dépourvu d'insert, on parle dans ce cas de clones négatifs ou vides. Le crible de clones représentant un ensemble de techniques utilisées afin de sélectionner les clones comportant le vecteur contenant l'insert et d'éviter ainsi les clones comportant un vecteur vide. Le crible de clones bleu-blanc est une technique qui se base sur la présence ou l'absence de l'activité β -galactosidase (où β -gal). Cette enzyme catalyse dans la nature la dégradation du lactose en glucose et galactose. Quand le lactose est remplacé par du X-gal, un analogue incolore, il est transformé par l'enzyme en 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole qui au contact de l'oxygène se transforme en 5, 5'-Dibromo-4, 4'-Dichloro indigo dont la couleur est bleue. Le vecteur utilisé pour réaliser un crible bleu-blanc contient au sein du site de multiclonage le gène codant la β -gal. Au cours du clonage l'insert est introduit au niveau du gène, après transformation les clones positifs contenant l'insert n'expriment pas l'enzyme, alors que les clones négatifs produisent cette protéine. La discrimination entre les clones positifs et négatifs s'effectue sur milieux solide contenant du X-Gal, les clones positifs présentent une couleur blanche et les clones négatifs présentent une couleur bleue (Figure 32).

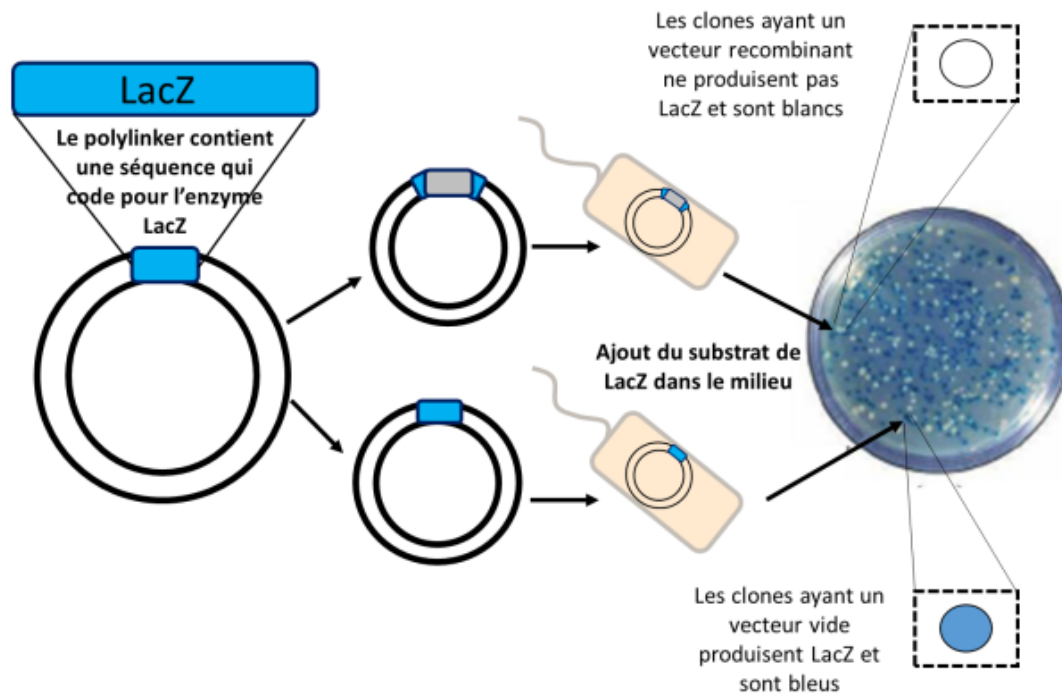


Figure 32. Principe de criblage bleu-blanc. Le vecteur contient le gène LacZ codant la β galactosidase au niveau du site de multicollonnage. En fonction de l'introduction ou pas de l'insert au sein du site de multicollonnage, les bactéries transformées produisent une couleur blanche ou bleue respectivement au contact du X-gal.

5. stratégie de modification de l'expression génique

- Surexpression d'un gène

Les promoteurs peuvent être divisés en promoteurs constitutifs (promoteurs forts) et inducibles. Les promoteurs constitutifs sont souvent associés à des régions "enhancer" qui peuvent augmenter l'activité transcriptionnelle de 10 à 200 fois par rapport à la transcription en l'absence de telles séquences. Les activateurs consistent en une série de modules qui se lient à des protéines spécifiques, ce qui les rend structurellement très similaires aux promoteurs. Souvent, ils sont éloignés du promoteur du gène apparenté. Certains activateurs viraux sont spécifiques à un hôte spécifique, tandis que d'autres (SV40, LTR RSV et CMV) sont actifs dans différents types de cellules chez différentes espèces. Ce sont les déterminants temporels et spatiaux de l'expression des gènes. Des exemples de promoteurs constitutifs comprennent : le promoteur de gènes précoces de SV40; le principal promoteur des gènes de la région tardif de l'adénovirus; le promoteur du virus du sarcome Raus (RSV); promoteur des gènes précoces immédiats du cytomegalovirus (CMV).

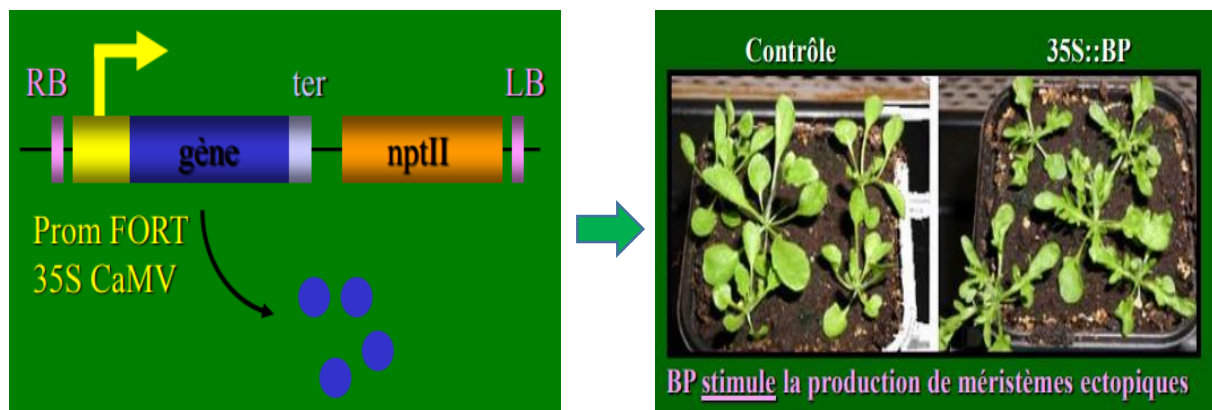


Figure 33. Surexpression d'un gène avec un promoteur fort.

5.1. Surexpression d'un gène avec un gène rapporteur

Le gène rapporteur est rajouté à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite. Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes codant des protéines fluorescentes comme GFP.

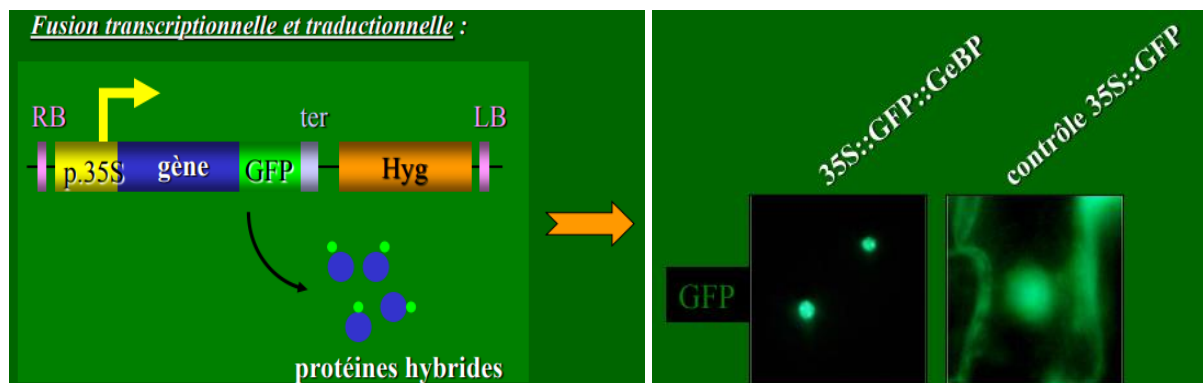


Figure 34. Surexpression d'un gène avec un gène rapporteur.

5.2. Systèmes inductibles d'expression de gènes

Il se peut que la surexpression d'un gène à un certain stade du développement soit létale. On a alors besoin d'un système inductible.

Exemple : promoteur induit par l'éthanol, en absence d'autres sources de carbone, le champignon *Aspergillus nidulans* est capable de métaboliser l'éthanol. En présence d'éthanol, le facteur de transcription ALC R se fixe sur les séquences régulatrices pAlcA et stimule la transcription des gènes du métabolisme de l'alcool (opéron) (Figure 35). Par ce mécanisme, *A. nidulans* s'assure de ne produire ces enzymes que si le substrat est présent.

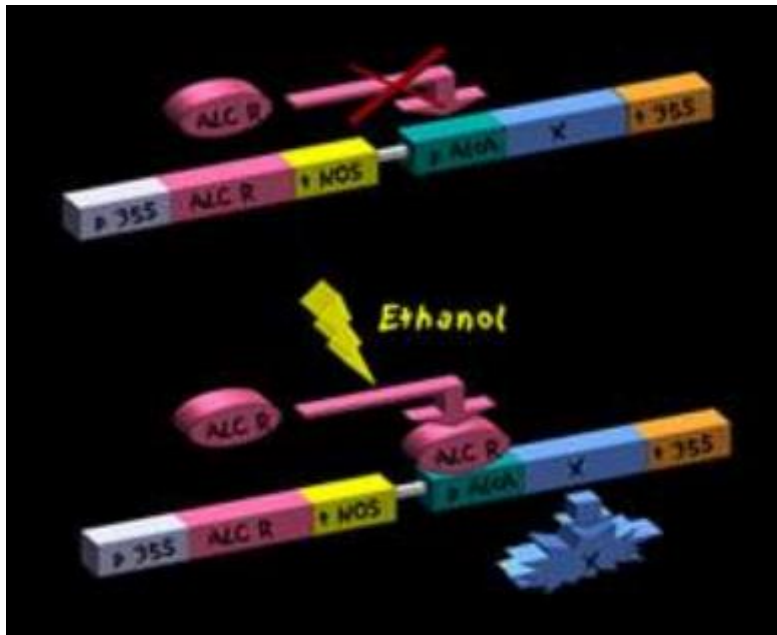


Figure 35. Systèmes inductibles d'expression de gènes

Le gène ALC R codant pour le facteur de transcription est exprimé de manière constitutive. En absence d'alcool exogène, ALC R n'est pas actif. L'apport d'éthanol exogène permet à ALC R d'activer la transcription à partir du promoteur pAlcA cloné en amont d'un gène d'intérêt. La protéine à étudier n'est produite qu'en présence d'alcool. Il se peut que la surexpression d'un gène à un certain stade du développement soit létale. On a alors besoin d'un système inductible. D'autres systèmes existent : choc thermique, métaux, etc.

6. Inactivation de gènes par ARN antisens

6.1. Découverte de l'ARN interférence

L'effet de la répression homologue dépendante a été observé par le laboratoire de Jorgensen en 1990. Dans l'optique de renforcer la couleur violette des fleurs de pétunia, les auteurs ont injecté un transgène codant une enzyme (l'anthocyanine) de la voie de biosynthèse du pigment qui donne la couleur violette à la fleur : la chalcone synthétase (CHS). Contrairement à l'effet souhaité, l'expression du gène endogène a été abolie et les fleurs sont devenues totalement ou partiellement blanches (Figure 36). Cet effet étant totalement réversible, les auteurs ont suggéré que l'inhibition du gène était dû à une interaction directe ou indirecte entre le gène endogène et le transgène. Des résultats similaires ont été observés au même moment dans le laboratoire de Stuitje.

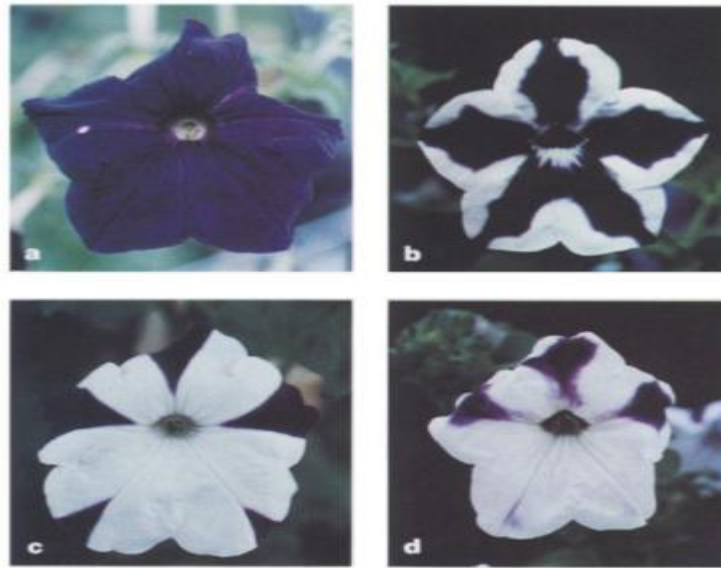


Figure 36. Décoloration des fleurs de pétunia. L'injection d'un transgène homologue à un gène de la voie de biosynthèse du pigment donnant la couleur violette à la fleur induit sa décoloration partielle ou totale. a) fleur sauvage, b-c-d) fleurs après différentes injections.

En 1995, Su Guo et Kenneth J. Kemphues ont découvert qu'une molécule d'ARN pouvait éteindre spécifiquement un gène chez *C. elegans*. L'injection de l'ARN anti-sens au gène dans les gonades de *C. elegans* induit la répression du gène endogène. Étonnement les auteurs ont observé le même effet avec une 2^e molécule d'ARN sens. Chez les plantes, ce mécanisme fut observé à plusieurs reprises (dans les pétunias, chez *Arabidopsis* ainsi que dans les plants de tabac, tomate et pommes de terre) et fut appelé post-transcriptionnel gene silencing (PTGS). De plus, il a été montré que des ARN viraux sont également capables d'éteindre spécifiquement des gènes. C'est seulement en 1998 que le mécanisme d'ARN interférence induit par ARN double-brin (ARNdb) fut décrit. Andrew Fire et Craig C. Mello ont étudié l'effet de l'injection d'ARN sens, d'ARN anti-sens ou d'un mélange des deux sur l'expression de plusieurs gènes de *C. elegans*. Ils ont remarqué que l'extinction de l'expression du gène est bien plus efficace avec le mélange des deux ARNs et en ont déduit que c'est l'injection d'ARNdb qui induit l'ARN interférence. Pour expliquer l'effet de l'injection d'ARN-sens ou anti-sens seul, les auteurs suggèrent que la transcription *in vitro* induit la contamination des préparations d'ARN-sens par quelques molécules d'ARN anti-sens (et inversement) conduisant à la production de quelques molécules d'ARNdb suffisantes pour induire l'ARNi. Le fait que la répression soit inductible par une quantité faible d'ARNdb et qu'elle puisse être maintenue dans la descendance des organismes injectés suggère un mécanisme d'amplification de l'ARN interférence. Cette découverte leur a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006.

Cette approche exploite un mécanisme naturellement présent chez les eucaryotes qui est l'extinction d'expression de gènes ou RNA silencing. Lors de cette approche, une version modifiée du gène cible est construite de telle sorte que les ARNm produits présente une structure Tige-boucle. Ceci est obtenue généralement par ajout de plusieurs résidu adénine et thymine des deux côtés de la séquence du gène (voir figure 37). La construction est exprimée dans l'organisme, les ARNm aberrant sont reconnus par la machinerie de silencing et une production de petit ARN interférents à lieu aboutissant à l'extinction d'expression du gène cible (Figure 37).

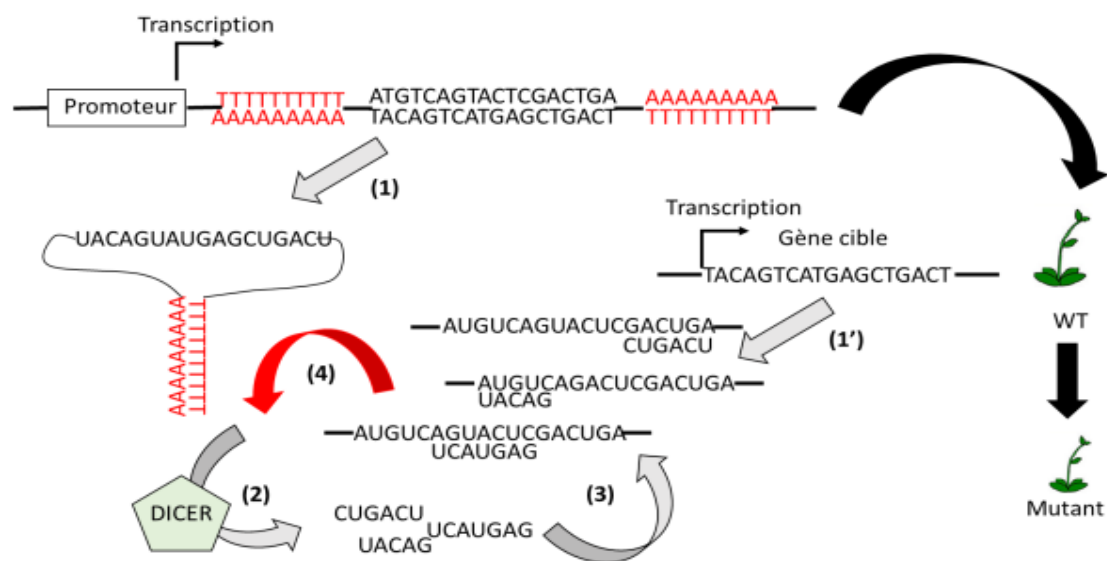


Figure 37. Principe du RNA silencing. Dans le but d’inactiver un gène, une version modifiée de ce dernier formant une structure tig-boucle est exprimée au sein de l’organisme (1). Les ARNm aberrants sont reconnus par la machinerie de silencing et des petits ARNs interférants sont formés (2) ce qui provoque la dégradation des ARNm endogènes (1’, 4) après la reconnaissance. Le phénotype du mutant est analysé afin de vérifier l’implication du gène ciblé dans le processus étudié.

Références bibliographiques

- Eberhard P. Atlas de poche de Génétique. Médecine Sciences Flammarion 2003.
- Klug W, Cummings M et Spencer C. Génétique 8ème edition. Pearson Education 2006.
- Maftah A, Petit JM, Julien R. Mini Manuel de Biologie moléculaire 4ème édition. Dunod 2018.
- Perazza D, cours génomique structurelle et fonctionnelle master 1. Université des frères Mentouri, 2011.
- Petit JM, Arico S, Julien R. Mini Manuel de Génétique 2ème édition. Dunod 2011.
<https://rnbio.sorbonne-universite.fr>



Chapitre 5 : Plantes modèles aux plantes d'intérêt agronomique

1. Une plante modèle

Une plante modèle est une espèce qui est étudiée de manière approfondie pour comprendre un phénomène biologique. Les observations tirées des études de cette espèce peuvent donc être, au moins partiellement, valables pour une autre espèce. Cela est possible parce que les principes biologiques fondamentaux comme les voies métaboliques, régulateurs, et développementales, et les gènes qui déterminent ces processus, sont proches de ceux observés dans d'autres plantes, qui sont souvent plus difficiles à manipuler.

2. Pourquoi des plantes modèles ?

La majorité des organismes modèles doivent répondre à certains critères

- Génomes simple et petit faciles à manipuler en laboratoire
- Leur cycle de vie et temps de génération sont relativement courts.
- Représentant d'un large éventail de plantes Exp : dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*) et monocotylédones (Riz)
- Outils disponibles
- Leur gènes doivent permettre une étude génétique, suivre les lois de Mendel et permettre l'induction de mutations.
- Ressources

3. Quelques exemples de plantes modèles

3.1. *Arabidopsis thaliana*

L'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) (Figure 38) est une petite plante de la famille de la moutarde (brassicacée). Elle sert d'organisme modèle pour la recherche génétique en botanique. L'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), avait été choisie comme plante modèle parce qu'elle présente, pour l'expérimentateur, toute une série d'avantages :

- Petite taille,
- Croissance rapide,
- Cycle reproductif court,
- Et surtout petite taille du génome.
- L'absence d'intérêt économique particulier d'*Arabidopsis thaliana* est un point favorable pour l'échange de données entre équipes de recherche.

Les chercheurs ont pensaient que la différence observée avec d'autres plantes connues pour avoir des génomes bien plus grands serait due essentiellement au fait que les gènes de l'arabette

existent en copie unique. Le séquençage a montré, au contraire, qu'au moins 70% des gènes de l'arabette sont dupliqués.



Figure 38. *Arabidopsis thaliana*

La taille du génome d'*Arabidopsis thaliana* est : 114 500 000 pb + 10 Mb (organisateurs nucléolaires et centromères) = environ 125 Mb. (Chromosome Chloroplastique 0,15 Mpb / Chromosome Mitochondrial 0,37 Mpb). La base de données TAIR contient 27416 gènes codant des protéines - 924 pseudogènes - 4827 transposon et pseudogènes. Mais environ 40 % des gènes ont une fonction qui n'est toujours pas connue. La taille moyenne des exons est 296 pb, la taille moyenne des introns : 165 pb et le nombre d'ARNt est 631. 79% des gènes d'*Arabidopsis thaliana* contient des introns.

***Arabidopsis thaliana* est l'espèce qui demeure le principal modèle d'étude en raison des avantages qui lui sont attachés :**

- Connaissance de la totalité de la séquence de l'*Arabidopsis thaliana*.
- Connaissance de la totalité de la séquence du génome,
- Existence de très nombreux mutants permettant de disséquer les voies métaboliques,
- Programmes de développement,
- Réponses aux stimuli environnementaux et mécanismes de base de la machinerie cellulaire.
- Possibilité de mettre en œuvre des approches génétiques directes ou inverses.

Quelques exemples des retombées chez les espèces cultivées de l'identification de la fonction des gènes chez *Arabidopsis thaliana* :

- Des gènes impliqués dans la libération des graines ont permis d'améliorer la production chez le colza.
- Des gènes responsables de la maturation des fruits ont permis d'augmenter la production de la tomate des homologues des gènes codant 2 enzymes impliquées dans le métabolisme de lipides poly-insaturés ont été identifiés chez le soja.

3.2. *Oryza sativa*

Le riz : Modèle pour la génomique des céréales

Le riz possède le plus petit génome parmi toutes les céréales (Génome : 450 millions de bases, 12 n, 50000-60000 gènes). *Oryza sativa* est une plante modèle et plante cultivée à la fois elle appartient à une famille très importante agronomiquement les poacées (blé, maïs, orge, sorgho, canne à sucre), son génome est entièrement séquencé. Il existe deux lignées de riz : *japonica* (Nipponbare) et *indica*. Le riz est adapté à divers écosystèmes.

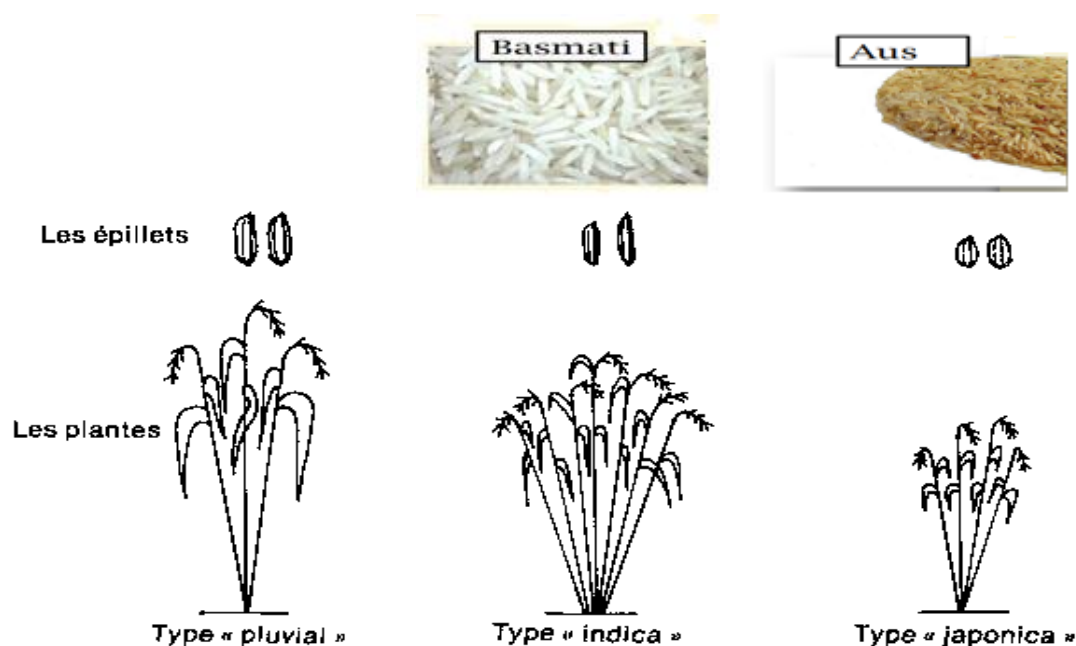


Figure 39. Les lignées *japonica* (Nipponbare) et *indica*

3.2.1. Origine et taxonomie du riz

Le riz est monocotylédone, herbacée, annuelle, appartenant à la famille des Poaceae. Le genre *Oryza* comporte environs, 24 espèces sauvages et 2 espèces cultivées. Le genre *Oryza* est probablement apparu il y a environ 130 millions d'années dans le Gondwana. Les espèces cultivées provenaient d'un ancêtre commun avec le génome AA.

Oryza glaberrima (riz africain) et *Oryza sativa* (riz asiatique) sont les deux espèces de riz cultivées. Alors que *O. sativa* est dominant en termes de superficie cultivée, *O. glaberrima*, qui est indigène à l'Afrique, reste important dans certaines régions du continent et essentiel aux programmes d'amélioration du riz car il offre un pool de gènes de résistance à un excès de stress biotiques et abiotiques. La libération du génome d'*O. glaberrima* contribuera énormément au développement de variétés tolérantes au stress, tandis que la caractérisation en cours des propriétés physicochimiques d'*O. glaberrima* révèle des traits uniques qui pourraient être exploités dans le développement d'aliments fonctionnels.



3.2.2. Classification

Tableau 3. Classification d'*Oryza sativa*

Règne	Plantae
Division	Magnoiophyta
Classe	Equistopsida
Super-ordre	Liliana
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Genre	Oryza

Le choix du riz s'appuie aussi sur des ressources pour l'approche génomique : On dispose d'excellentes cartes génétiques et des techniques de transformation génétique qui font du riz la céréale la plus facile à transformer.

Il existe un très grand nombre de variétés de riz : plus de (150.000 variétés cultivées, 107000 accessions). variétés traditionnelles et espèces sauvages de riz sont gérées par l'IRRI (international Rice Research Institute).

Le riz constitue la base quotidienne de l'alimentation de plus de la moitié de l'humanité. Ainsi, la connaissance du génome du riz est extrêmement précieuse pour les sélectionneurs dans le but d'augmenter le rendement et créer de nouvelles variétés résistantes aux maladies, aux ravageurs, à la sécheresse ou à la salinité

Le génome complet du riz a été publié en 2002 :

- Yu et al. (2002) "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)" *Science* 296, 79.

- Goff et al. (2002) "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)" *Science* 296, 92.

- International Rice Genome Sequencing Project (2005) "The map-based sequence of the rice genome" *Nature* 436, 793 – 800.

* Base de données pour l'annotation du génome du riz: RAPDB ("Rice Annotation Project Database").

3.2.3. Cycle de développement

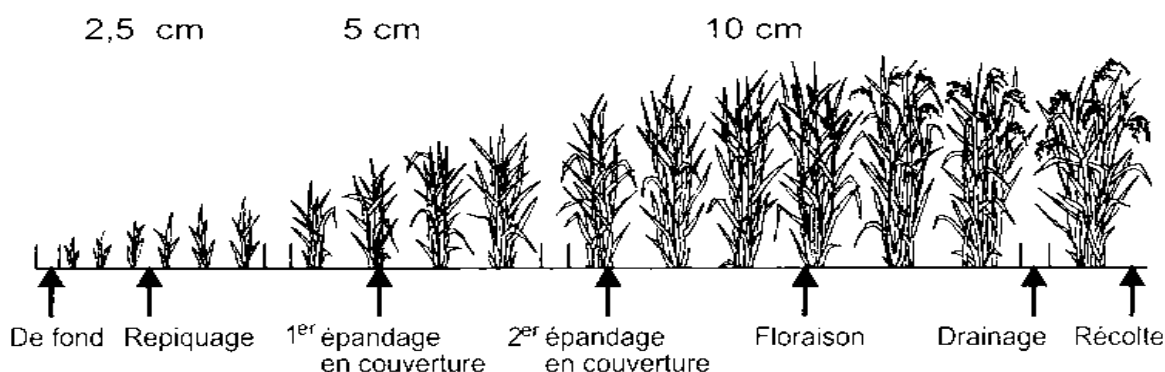


Figure 40. Cycle de développement du riz (125 à 160 jours)

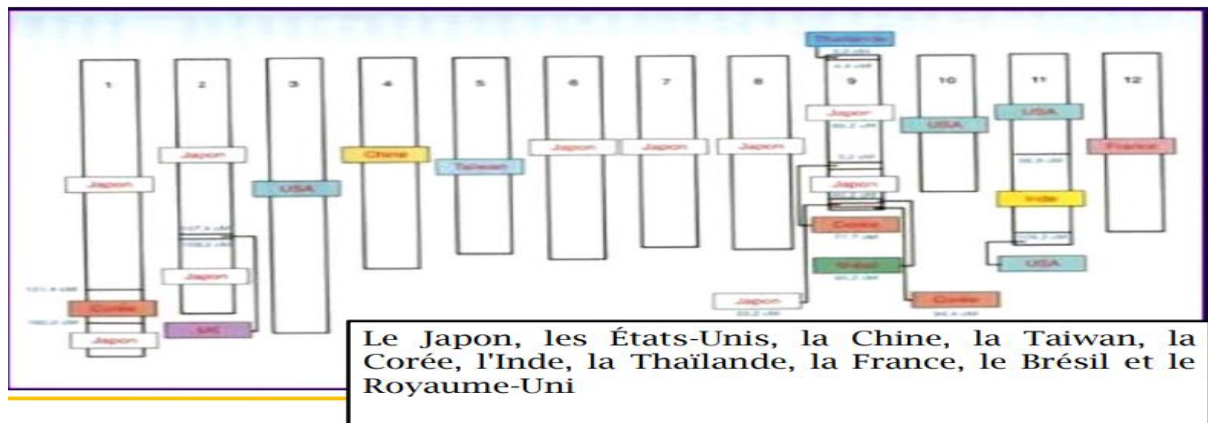
3.2.4. Outils disponibles

- Possibilité d'extinction de gènes par RNAi.
- Collections de lignées de mutants d'insertion.
- Analyses transcriptomiques possibles.
- Outils de criblage génétique (TILLING).
- Transformation génétique possible.
- Collection d'ADNc et marqueurs moléculaires de type microsatellites avec identification de polymorphismes de type SNPs.

3.2.5. Utilisation comme modèle

Le plus petit génome : 430Mb , parmi les céréales.

Le Projet international de séquençage du génome du riz (IRGSP).



- 37.544 gènes identifier et dont la position a été établie sur les 12 chromosomes du riz. 50% de séquences répétées.
- Pas de bouleversement dans les classes fonctionnelles de gènes (Exemple : facteurs de transcription).
- 15 à 20% de la variété *japonica* absente de la séquence *indica*.

3.2.6. Génomique comparative riz-céréales

Parmi les 13 000 familles géniques du riz, 10 900 sont représentées chez le maïs et 11 500 chez le sorgho alors que 1 200 semblent spécifiques du riz.

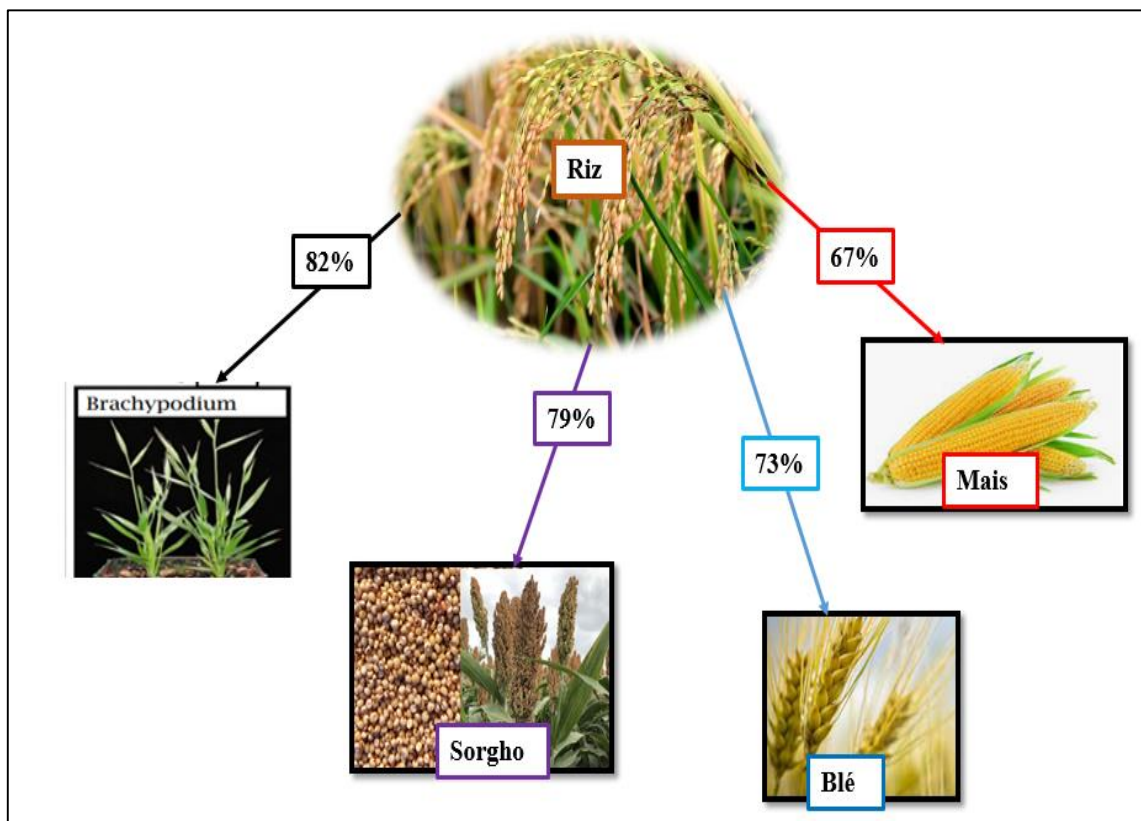


Figure 41. Génomique comparative riz-céréales.

Le riz peut servir de génome modèle pour :

- Plante à fleur monocotylédone
- Dicotylédones

Le riz constitue déjà un modèle dans plusieurs domaines :

- Travaux sur le rendement
- Génétique de la résistance aux maladies
- Réponses adaptatives
- Repérer les gènes intéressants d'un point de vue agronomique

La génomique du riz, a permis de dresser un premier catalogue des gènes du riz, mais il reste encore à en découvrir et valider la fonction. Plus de 600 gènes, dont certains ont une importance majeure, ont ainsi déjà été validés.

- Date de floraison.
- Qualité culinaire
- Tolérance aux pathogènes.
- Tolérance à certains stress abiotiques.

Les informations obtenues chez le riz (structure et fonction des gènes) peuvent être transférées aux autres espèces proches dont le génome complexe n'est pas encore correctement séquencé.

L'utilisation des informations acquises grâce à la séquence des génomes du riz, du maïs et du sorgho, a permis de cloner, chez le blé, un gène de glutamate synthase, responsable d'un QTL majeur d'efficacité de l'utilisation de l'azote.

L'existence d'une correspondance entre le chromosome 12 du riz et une région du chromosome 5 du blé où l'on a cartographié un locus génétique impliqué dans la dureté des grains de blé.

Une séquence du chromosome 7 du riz qui contrôle la date de la floraison retrouvée chez le chromosome 2 du blé.

3.3. *Solanum lycopersicum* (la tomate)

Modèle pour les solanacées et les fruits charnus

Plante herbacée appartenant à la famille des Solanacées. Les Solanacées comportent 3000 espèces, bien qu'il y a 7000 variétés de tomates, elles représentent toute la même espèce.

3.3.1. Classification

Tableau 4. Classification de la tomate

Règne	Végétale
Embranchement	Angiosperme
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Solanale
Famille	Solanacées
Genre	Solanum
Espèce	S. lycopersicum

La tomate a eu plusieurs noms scientifiques au fil des ans.

- *Solanum lycopersicum*
- *Lycopersicon esculentum*
- Linnaeus l'ayant classée dans Genre *Solanum*

3.3.2. Caractéristiques visibles

Philippe Miller l'ayant classée dans Genre *Lycopersicon*



Figure 42. Différents formes de *Lycopersicon*

Bien que phénotypiquement assez diversifiée, mais son ADN présente très peu de polymorphisme. En contrepartie, les espèces sauvages représentent un énorme réservoir de variabilité génétique.

3.3.3. Origine et production

Au 20ème siècle, la tomate (*Solanum lycopersicum*) est consommée dans le monde entier.

Selon la FAO, elle cultivée par 170 pays dans le monde, sa production globale est estimée à 130 millions de tonnes.

La Chine serait le premier producteur avec 40 millions de tonnes. L'Europe est numéro deux, et produit autour de 16 millions de tonnes de tomates. Les autres pays qui ont un taux de production élevé sont : les USA, l'Inde, le Maroc, l'Égypte et l'Iran. Les plants de tomates sauvages viennent de la région montagneuse (les Andes) d'Amérique du Sud : le Pérou, la Bolivie, le Chili et l'Équateur. D'abord été cultivées par les Aztèques et les Incas. Les espagnoles l'introduisirent rapidement en Europe après avoir conquis le Mexique.

3.3.4. Description de la plante

Plante herbacée vivace dans sa région d'origine, mais annuelle en culture. La tomate est une plante autogame.

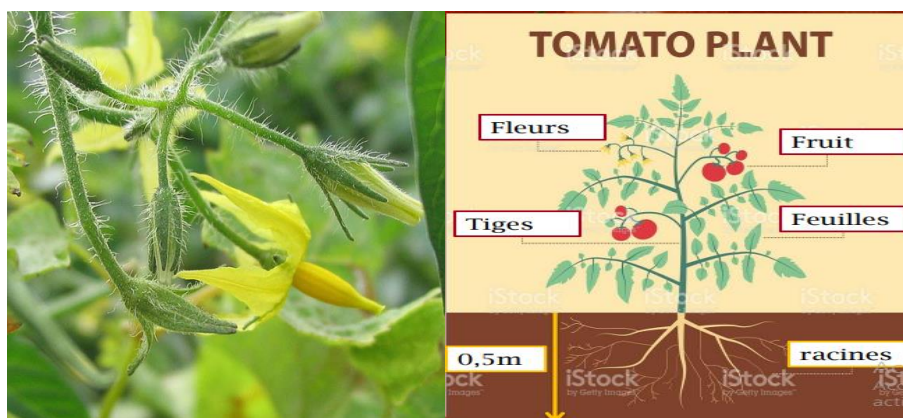


Figure 43. Description de *Lycopersicon*

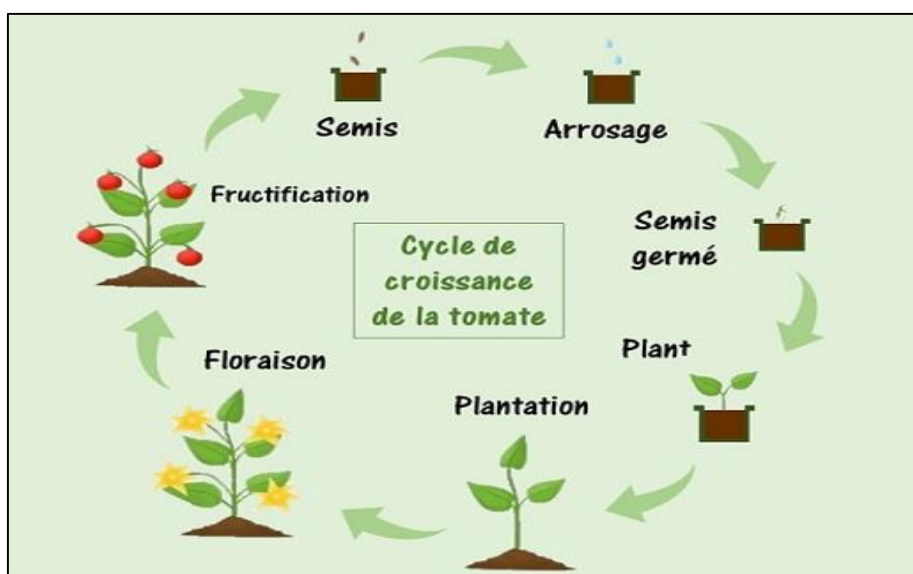


Figure 44. Cycle de développement de *Lycopersicon*

3.3.5. Utilisation comme modèle

Le plus petit génome diploïde de la famille des Solanacées : 900Mb, dont 220Mb d'euchromatine. Projet de séquençage international, Tomato Genome Consortium, TGC. (14 pays 300 chercheurs : quinze espèce sauvage *Solanum pimpinellifolium*).

Ce séquençage révèle en fait que le génome de cette solanacée qui possède 12 chromosomes, compte 35000 gènes dont, l'ordre, la position et l'orientation ont été révélés.

Les comparaisons génétiques réalisées avec les autres génomes de plantes a révélé que : 8615 gènes été commun aux 5 génomes, groupe de gènes spécifiques aux solanacées et seulement 562 spécifique à la tomate.

La tomate sert de modèle à la famille des solanacées, et comme modèle pour les fruits charnus. Malgré la très grande diversité des fruits charnus, tous présentent des processus de développement, de la fécondation au mûrissement du fruit, très similaires entre les espèces d'Angiosperme.

La tomate s'avère utile pour étudier ces processus et elle s'est imposée comme modèle pour de nombreuses espèces d'intérêt agronomique telles que le raisin, la pêche, le melon, la pomme ou la fraise. La tomate est également intéressante à cause de son intérêt économique croissant.

3.3.6. Outils disponibles

- Collection de 1008 lots d'espèces sauvages.
- Collection des 877 mutants monogénique (mutagenèses par EMS révélés par méthode de TILLING notamment et par insertions de T-DNA).
- Nombreux marqueurs moléculaires : RFLPs, AFLPs, SSRs, SNPs.
- Grande collection d'ESTs (>250 000 environ).
- Transformation génétique possible.
- Analyses QTLs, protéomes et transcriptomiques possibles.
- Extinction de gènes par RNAi ou par VIGS (Virus Induced Gene Silencing).

3.4. *Medicago truncatula*

La luzerne tronquée modèle pour les légumineuses et les interactions plantes-microorganismes

3.4.1. Classification taxonomique

Tableau 5. Classification de la luzerne tronquée

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Medicago</i>

3.4.2. Origine et production

Les légumineuses jouent un rôle économique majeur. Source des protéines, des lipides, source alimentation humaine et animale

3.4.3. Intérêt agronomique

- Aptitude à la fixation symbiotique de l'azote
- Production de protéines végétales même en l'absence de fertilisation Rotation agricole et conservation des sols Agriculture

3.4.4. Description de la plante

Plante fourragère, annuelle couverte de petits poils. Plante autogame. Tige fruit : gousse velu portant des épines. 20-40cm velue, ramifiée, prostrée une profonde racine pivotante (jusqu'à 7,5 m de profondeur) feuilles trifoliées, fleurs hermaphrodites, cycle de développement : 10-12 semaines.

3.4.5. Outils disponibles

Transformation génétique et embryogénèse somatique. Collection de mutants (mutagenèses par agents physico-chimiques et mutagenèse insertionnelle). Banque d'ESTs et de cDNA. Nombreux marqueurs moléculaires : RFLPs, RAPDs, SSRs. Invalidation de gènes par knock out. Analyse transcriptomiques

3.4.6. Utilisation comme modèle

L'utilisation d'une légumineuse modèle présente différents avantages sur le plan fondamental et appliqué.

- Comparer, dans un même végétal, les symbioses avec les interactions pathogènes et gènes de résistance (*Arabidopsis thaliana*).
- De nombreux marqueurs génétiques.
- Cartes génétiques bien développées et un certain nombre d'outils génomiques.

Deux légumineuses, *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, ont été proposées comme modèles et sont utilisées par de nombreux laboratoires. *M. truncatula* est plus proche sur le plan phylogénétique de la plupart des Légumineuses cultivées. *M. sativa* *M. truncatula* *Macrotyphlocyba* conservée Soja *M. truncatula* *Microtyphlocyba* conservée Pois *M. truncatula* Très proche.

3.5. Le peuplier (*Populus trichocarpa*) espèce nord-américaine

Populus trichocarpa est un arbre de la famille des Salicacées présente plusieurs qualités faisant de lui un bon modèle d'étude pour comprendre la physiologie des arbres. Ses différentes espèces peuvent vivre sous des climats très variés : Europe, Asie, Amérique du Nord et même en Afrique équatoriale Sa croissance est très rapide et il a une importance économique, il est très recherché par les industriels. La taille de son génome 480 millions de bases n = 19. La séquence du génome a été publiée en 2006. Séquençage systématique 45000 gènes



Figure 45. Le peuplier (*Populus trichocarpa*)

La culture des peupliers présente deux atouts majeurs : La qualité de leur bois, la rapidité de leur croissance. Ces arbres dioïques peuvent être plantés mais aussi cultivés comme une plante de grande culture. Il sert à la fabrication de meubles légers, la construction et à la charpente.

3.5.1 Le peuplier comme modèle

Présents dans tout l'hémisphère nord. Espèces résistante à des contraintes naturelles très variées. Il a une résistance variée à divers parasites, ainsi que son importance économique et développement du populiculteur. C'est le premier arbre séquencé et la 3^{ème} plante après *Arabidopsis* et le riz.

Son projet de séquençage est réalisée par une équipe internationale de 200 scientifique. Dont 45500 gènes identifiés, génome ayant subi deux duplication, la comparaison avec *A. thaliana* permet de : L'identification de 19000 gènes orthologues. Le peuplier possède plus de gènes codant pour des protéines servira de guide pour l'Eucalyptus et le Pin

Références bibliographiques

- Afrique renouveau,
(<http://www.un.org/french/ecosocdev/geninfo/afrec/vol17no4/174ricefr.htm>) Consulté le 01/12/2021.
- La classification proposée ici s'appuie sur une synthèse récente : Vaughan, D. A., Morishima, H. & Kadowaki, K. (2003) Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 : 139-146
- Perazza D, cours génomique structurelle et fonctionnelle master 1. Université des frères Mentouri, 2011.
- Refdoc - CNRS - inist - Besancon Gilles - Université de Paris 11
(<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=160583>)
- Voir sur les sites du Centre du riz pour l'Afrique (Africa Rice) (<http://www.africarice.org/warda/adrao/default.asp>) et du Département de l'information des Nations Unies.



Chapitre 6 : OGM d'aujourd'hui et de demain : aspect éthiques et économique.

1. Introduction

La sédentarisation des communautés et les premières activités agricoles se situent au Néolithique (-10 000 à -2 000 avant notre ère). L'homme passe du stade de chasseur-cueilleur à celui de producteur, domestiquant des animaux et le milieu naturel en semant des graines, développant des travaux d'irrigation, de fumure, de bouturage ou de labour. Très tôt, les agriculteurs ont pratiqué la sélection de plantes ou de certains animaux d'élevage, agissant sur des données naturelles. Il est probable que, dès les origines de la vie, divers phénomènes se sont produits sans l'intervention de l'homme, tels que des transferts de gènes qui ont favorisé la création d'espèces nouvelles, par hybridation. On considère ainsi qu'environ le tiers des espèces végétales vivantes ont évolué à partir d'hybrides naturels parmi lesquels des hybrides végétaux qui ne sont pas forcément stériles. Au milieu du XX^e siècle et, plus particulièrement, au cours des dernières années, se sont développées de nouvelles techniques d'implantation de gènes dans des organismes hôtes, à partir des connaissances acquises sur la structure moléculaire de l'ADN et des éléments de base.

2. OGM et transgénèse

Un organisme génétiquement modifié (OGM) est un organisme vivant micro-organisme, végétal ou animal ayant subi une modification, non naturelle, de ses caractéristiques génétiques initiales, par ajout, suppression ou remplacement d'au moins un gène. L'opération correspondante est dite transgénèse. Elle peut s'effectuer aussi bien sur des cellules germinales (gamètes) transmettant la modification à la descendance que sur des cellules somatiques (non reproductrices). Dans ce cas, le caractère modifié n'est pas transmissible. Les techniques du génie génétique sont issues de la recherche en biologie moléculaire, en médecine, en agriculture mais aussi en chimie ou en physique. Le principe est de transférer, dans une cellule de l'organisme receveur, un ou plusieurs gènes prélevés dans un autre organisme vivant, y compris si celui-ci n'est pas de la même espèce que "l'hôte" : une compatibilité possible grâce à l'universalité du code génétique. Les nouvelles constructions se font à partir du patrimoine génétique d'un individu, c'est-à-dire d'une grande partie de ce qui le singularise et le définit biologiquement.

3. La transgénèse en amélioration des plantes

3.1. L'apport et la place de la transgénèse

Pour le sélectionneur, la technique de transgénèse présente essentiellement deux avantages. D'une part, la transgénèse est une méthode de transmission très précise, puisqu'on peut ne transférer que le gène d'intérêt alors que, par les techniques de rétrocroisement, on transfère en même temps plusieurs dizaines, voire centaines d'autres gènes, même en faisant appel aux marqueurs moléculaires. Cet avantage est encore plus net avec la transgénèse ciblée. D'autre part, la transgénèse peut être une source nouvelle de variabilité et c'est sans doute l'un de ses intérêts majeurs. Elle permet, par exemple :

- d'introduire des gènes de résistance, aux maladies ou aux insectes, chez les espèces où aucun gène de résistance n'était connu (exemple de la résistance aux insectes) : d'une certaine façon, la transgénèse accroît les ressources génétiques utilisables par le sélectionneur ;
- de modifier la qualité des produits, là où il n'y avait pas, naturellement, de variabilité suffisante de la qualité (cas de l'huile de colza riche en acide l'aurique ou linoléique) ;
- de faire s'exprimer le gène dans l'organe souhaité, au moment voulu avec plus d'intensité, ou encore de surexprimer certains gènes affectant des caractères quantitatifs et augmenter ainsi, pour ce caractère, la valeur du génotype transformé.

Actuellement, la transgénèse ne permet pas toujours un gain de temps puisque. Les transgènes sont souvent introduits dans des génotypes favorables au transfert (transformables par *Agrobacterium*, ou régénérant facilement) mais ne possédant pas nécessairement tous les autres caractères souhaités par le sélectionneur ils doivent donc, ensuite, être introduits par rétrocroisement (assisté par marqueurs) dans les génotypes souhaités. Il y a toutefois un gain de temps lorsqu'il s'agit d'introduire des gènes d'une espèce éloignée : par exemple l'introduction chez le blé de la résistance au **piétin verse** présente chez *Aegilops*, qui a demandé quinzaine d'années de travaux, serait aujourd'hui possible par la transgénèse en moins de quatre ans.

La durée de création d'un événement transgénique et de son introduction du matériel amélioré est quelquefois avancée comme un inconvénient de genèse, lorsqu'il s'agit de caractères qui peuvent aussi être améliorés par la voie conventionnelle, assistée par marqueurs ou non. En effet, pendant tout le temps pris pour créer, puis transférer, un transgène, le progrès génétique continue par la voie conventionnelle. Cependant, les deux méthodes ne sont pas concurrentes

elles sont complémentaires, puisque la transgénèse apporte une variabilité génétique supplémentaire, même pour les caractères pouvant être améliorés par la voie conventionnelle. À terme, c'est donc la combinaison des deux voies qui permettra d'avoir le progrès génétique maximal. On peut penser que ce sera le cas, par exemple, de l'amélioration de la tolérance au stress hydrique. De plus, dans ce cas- là, la transgénèse présente l'avantage de pouvoir introduire des gènes qui ne seront induits qu'en cas de stress, ce qui peut diminuer l'impact négatif éventuel de ces mécanismes de tolérance. Alors la transgénèse marque-t-elle une rupture dans les techniques d'amélioration des espèces ? Sans doute pas plus que d'autres techniques, comme l'haplodiploidisation ou les marqueurs moléculaires utilisés dans le cadre de la sélection génomique. C'est un outil de transfert de gènes, très efficace tant au niveau intraspécifique qu'interspécifique, mais c'est surtout un outil qui génère une nouvelle variabilité génétique. La transgénèse augmente la puissance du sélectionneur, mais elle ne remet pas en cause l'amélioration conventionnelle. Les transgènes doivent, en effet, être introduits dans des génotypes améliorés pour beaucoup d'autres caractéristiques quantitatives, non monogéniques. Pour des caractères complexes, comme la tolérance à la sécheresse ou la valorisation de la fumure azotée, la transgénèse est un moyen d'apporter une variabilité génétique supplémentaire permettant d'aller plus loin dans le niveau d'amélioration de ces caractères.

4. Applications agronomiques des OGM

Une fois que sont identifiés des organismes dans lesquels se trouvent des gènes présentant un intérêt spécifique, il est possible de les reproduire : par croisement "conventionnel" ou en utilisant des techniques de transfert génétique aux fins d'amélioration d'une variété de plante.

On utilise des C'est notamment dans le but de remplacer certains produits chimiques, insecticides, pesticides, fongicides, que s'est développée la transgénèse végétale. On a aussi expérimenté celle-ci sur des plantes comme la pomme de terre, le coton, le riz, le tabac, le principe étant encore de leur conférer une résistance autonome...qui ne soit pas toxique.

Un gène de tolérance aux herbicides peut être également introduit dans une plante. Celle-ci devient alors résistante à cet herbicide qui détruit toutes les autres plantes concurrentes de la culture, les "mauvaises herbes". Ce procédé, bien géré, pourrait permettre, en diminuant la quantité d'herbicides utilisés, de réduire la pollution liée à l'agriculture. La résistance aux maladies virales préoccupe aussi les cultivateurs. Des plantes transgéniques capables de résister à certaines d'entre elles ont ainsi été construites et étudiées dans un but expérimental et en conditions de confinement : pommes de terre, melons, concombres, betteraves, tomates.

Une fois que des organismes avec un gène d'intérêt particulier ont été découverts, il est possible de les reproduire : par des croisements « conventionnels » ou par l'utilisation de techniques de transfert génétique pour améliorer plusieurs races de plantes ou d'animaux d'élevage. Produits chimiques, pesticides, insecticides, fongicides sont utilisés pour protéger les plantes. En particulier, certains de ces produits toxiques ont été développés pour remplacer les transgènes végétaux. Nous avons également expérimenté cela sur des plantes comme la pomme de terre, le coton, le riz, le tabac, et la logique est toujours de leur donner une résistance autonome... qui est non toxique. Des gènes de tolérance aux herbicides peuvent également être introduits dans les plantes. Il développe alors une résistance à cet herbicide, qui détruit toutes les autres plantes qui concurrencent la culture, les "mauvaises herbes".

➤ Exemple : LA PYRALE DU MAÏS

Le *Bacillus thuringiensis* ou Bt est une bactérie du sol qui produit une toxine insecticide à laquelle seuls les papillons sont sensibles. Un gène de Bt est introduit dans le maïs qui va fabriquer lui-même la toxine insecticide et devenir résistant à la pyrale

Le principe est de transférer à la plante des éléments du matériel génétique viral qui puissent entraver, par des mécanismes encore incomplètement élucidés, la multiplication ou la diffusion du virus. Des recherches sont aussi menées pour favoriser la culture de riz, café, coton, dans des conditions climatiques variables ou extrêmes, sécheresse, hautes ou basses températures, propres à certaines régions. Améliorer les qualités nutritionnelles de produits alimentaires est, enfin, l'un des objectifs poursuivis.

5. Impact des OGM

5.1. Impacts sur la santé

L'ingestion de produits contenant ou dérivés d'OGM peut conduire à une incertitude quant à la présence de substances indésirables susceptibles de provoquer des réactions allergiques, affectant éventuellement la flore digestive. Les échanges de gènes entre cette flore et les microorganismes externes sont extrêmement rares. Cependant, ils ne peuvent pas être exclus. Dans certains cas, les gènes de résistance aux antibiotiques qui rendaient la sélection transgénique n'étaient ni éliminés ni inactivés, et il y avait des raisons de craindre que des bactéries résistantes aux antibiotiques n'émergent chez l'homme. Par ailleurs, les aliments pour animaux ciblant les plantes génétiquement modifiées font l'objet de recherches et de suivi de la santé animale et des consommateurs. La traçabilité des produits que nous consommons est

cruciale : elle seule permet de savoir comment ils ont été obtenus. Pour pouvoir le garantir, notamment en ce qui concerne les ingrédients génétiquement modifiés.

5.2. Impacts sur l'environnement

Ces observations sont particulièrement intéressantes pour la dissémination des gènes dans les plantes génétiquement transformées. Le pollen est le véhicule privilégié pour la propagation des gènes végétaux. Toutes les cellules d'un organisme transgénique contiennent le transgène ainsi présent dans le pollen. Les cultures transgéniques peuvent ensuite être fertilisées pour transmettre le transgène aux plantes voisines, qu'elles soient cultivées ou sauvages, et permettre par exemple de "régénérer" des cultures résistantes aux herbicides. D'autres études ont impliqué des animaux. Certains peuvent s'échapper, comme les poissons d'élevage qui se croisent avec des individus sauvages. La propagation des bactéries ne peut pas non plus être exclue. Vous devez être en mesure de suivre toutes les extensions. Il existe donc des risques potentiels, dont une réduction de la biodiversité, voire une modification de l'équilibre entre les populations de sujets pharmacorésistants.

6. Aspects socio-économiques

Les avantages économiques potentiels de l'utilisation du génie génétique sont multiples et peuvent être considérables, mais étant donné que les plantes génétiquement modifiées n'ont été cultivées que dans un petit nombre de pays depuis 1995, il y a encore un manque de données pour étayer ou valider empiriquement ces avantages possibles.

L'introduction d'un trait souhaité dans un organisme par transfert de gène est beaucoup plus rapide que l'induction du même effet par des méthodes de sélection classiques. Ce facteur temps joue un rôle important dans l'estimation de l'efficacité et des coûts de production. Elle intervient dans des stratégies de changement des conditions de production agricole ou industrielle. Pour en mesurer l'avantage, elle nécessite encore une comparaison globale avec les méthodes traditionnelles : investissement en recherche d'une part, et bénéfices effectivement réalisés d'autre part de bénéfices effectivement obtenus dans les domaines agro-économiques, environnementaux, et concernant la qualité.

Le développement de plantes résistantes aux herbicides, aux insectes, aux virus et à divers agents pathogènes peut réduire les traitements chimiques ou réduire les pertes de production lorsqu'il n'y a pas de traitements économiquement disponibles. Le génie génétique peut accroître l'efficacité de la production agricole et accroître la productivité dans des conditions

difficiles, en particulier dans les pays en développement. De plus, la possibilité d'une conservation plus longue des fruits ou légumes permet une récolte plus tardive ou d'améliorer leur aspect à maturité. Les consommateurs sont sensibles à l'apparence, au goût et à la qualité des produits proposés et à la moindre toxicité associée à la manipulation des résidus de produits

Obtention de riz causant moins d'allergies. Certaines qualités nutritionnelles peuvent être mieux équilibrées en acides gras ou en vitamines... Afin de réduire les dangers potentiels de certains médicaments, comme l'hormone de croissance, leur production génétiquement modifiée offre des perspectives d'avenir. Cependant, l'une des principales préoccupations des producteurs est leur autonomie économique. Ils craignent que les OGM n'entraînent un contrôle et une exclusivité par des groupes multinationaux, une hausse des prix des semences, une concentration du secteur semencier et l'abandon des spécificités régionales ou locales.

7. La perception sociale des OGM

Alors que les statistiques montrent que la santé et la sécurité alimentaire dans notre société et dans d'autres pays industrialisés s'améliorent régulièrement, l'attention du public augmente également, notamment en raison des progrès de la science. Une partie du public pense qu'il est menacé par les multiples dangers posés par la nouvelle technologie. Certains risques sont plus forts que d'autres, quel que soit leur impact réel. Alors que des progrès peuvent être attendus, la recherche génétique et la biotechnologie ont suscité des débats houleux qui pourraient entraver leur progression. La biotechnologie est remise en question économiquement et socialement. La désignation du risque et son amplification révèlent une critique de la société et de sa logique de profit immédiat. Il semble que l'expression de sentiments pour ou contre les OGM dépende moins des données scientifiques et plus des perceptions de la nature et de la société. Par ailleurs, si le public fait généralement confiance aux scientifiques, il se méfierait de tous les autres "parties prenantes" : industriels, gouvernements, administrations... Ainsi, il apparaît aujourd'hui indispensable de disposer d'une source diversifiée d'expertise et d'information. Il n'y a pas de vérité absolue en science, mais la démarche scientifique nous permet de faire la distinction entre ce qui est faux ou hautement improbable et ce qui est réel, incertain ou très probable. Le public est le partenaire auquel les éléments du débat doivent être soumis. Plus l'incertitude est grande, plus le besoin de recherche, de confrontation et de connaissances accrues est grand pour aider la prise de décision publique à émerger du domaine émotionnel.

8. Aspects éthiques ou morales

Comme la biotechnologie en général, le génie génétique soulève des questions éthiques et morales très complexes. La question la plus fréquemment posée concerne la tendance humaine à violer les lois de la nature, en particulier l'exploitation infinie du monde biologique en franchissant certaines barrières et hypothèses biologiques. La découverte de l'universalité du code génétique marque une rupture avec le concept d'espèce, développé par Linné au XVIII^e siècle. Jusqu'à présent, une espèce a été considérée comme une classe d'organismes fertiles présentant des similitudes morphologiques. Or, le fait de transférer des gènes sans modifier l'identité initiale de l'organisme vivant receveur, sans qu'il y ait un nécessaire apparemment entre le donneur et l'hôte, est une opération qui suscite des débats philosophiques ou même religieux : l'homme ne fait-il pas violence à la création ? Les transferts de gènes, par exemple entre bactéries, existent depuis plus d'un milliard d'années. Les plasmides se répliquent indépendamment du chromosome bactérien, codent leur propre transfert, y compris entre des espèces bactériennes distinctes. Il existe aussi des "gènes sauteurs" dits encore transposons, conférant de nouvelles propriétés à divers végétaux, comme certaines résistances aux antibiotiques. Enfin, depuis que l'homme cultive le sol et en tire sa nourriture, il l'a changé, mais pas nécessairement. Si les pays à faible niveau de ressources et d'espérance de vie, si les déséquilibres Nord-Sud régressent, notamment par un meilleur accès aux outils technologiques, alors la morale et l'éthique l'emporteront. Dans ce domaine comme dans la technologie, la plus grande vigilance est indispensable pour y parvenir.

9. Débat scientifique (Atelier)

Organiser à la fin de la séance un débat autour des OGM agro-alimentaires :

➤ Les objectifs de cette activité

- Développer l'esprit critique, apprendre à argumenter son opinion, être à l'écoute et accepter le point de vue argumenté de l'autre.

➤ Description de l'activité

Au préalable, on constitue trois groupes d'étudiants réparti comme suit : un groupe pour les OGM, un groupe contre les OGM et un dernier intermédiaire (neutre).

À l'entrée au cours, la constitution des groupes est déjà affichée au tableau par vidéo projection de sorte que les étudiants s'installent en conséquence dans la salle. Cette première séquence s'articule en 4 moments :

- Premièrement, chaque groupe doit très rapidement choisir un rapporteur pour l'oral.
- Ensuite, chaque groupe est chargé de définir les critères d'analyse (sur la santé, l'environnement, éthique et morale, législation ...). Pour cela, la consigne suivante est donnée aux étudiants : « Sachant que vous avez dans votre enveloppe 4 à 5 documents de nature diverse (article scientifiques, documents vidéo, documents audio, schémas, graphiques...), recherchez les arguments que vous pourriez proposer pour construire une présentation oral pour appui votre opinion.
- Au bout de 15 minutes, on procède à la mise en commun. Les rapporteurs de chaque groupe présentent les points retenus avec un affichage progressif au tableau de la diapositive collective ainsi obtenue.
- Ensuite, chaque groupe commence à présenter ces arguments et débattre.

Références bibliographiques

- Espèces modèles végétales à l'INRA (<https://journals.openedition.org/hrc/3222>) consulté : 4 novembre 2021.
- Biotechnologies : les médicaments OGM débarquent 21 juin 2007, *Biomagazine* cité des sciences
- « Qui tire profit des cultures OGM ? », (consulté le 1 Décembre 2022), rapport de Les Amis de la Terre.
- Pas d'application en janvier 2006, cf. «Un survol des techniques et des applications actuelles de la transgénèse animale », Louis-Marie Houdebine, article dans *L'Observatoire de la génétique*, janvier 2006.
- Christophe Noisette, « Les animaux génétiquement modifiés : pas vraiment au point », *Inf'OGM 146*, juillet / août 2021)



Chapitre 7 :
Introduction à l'édition du génome
/CRISPER/Cas

1. Introduction

Des outils puissants ont été développés pour décrypter la structure du génome, permettant d'accéder à de vastes quantités d'informations sur les mutations et les altérations des séquences d'ADN pour définir et identifier leur rôle dans le développement de la pathologie. Après la transgénèse, une succession rapide de techniques de manipulation du génome s'ensuit. Les exemples incluent la mutagenèse dirigée par les oligonucléotides, les nucléases dirigées par les doigts de zinc, les méganucléases, Talen, Crispr-Cas9 (Jean-Yves et Procaccia, 2017).

CRISPR/Cas9 est une découverte clé dans l'histoire des sciences de la vie, soulignant l'importance de la recherche fondamentale. Cela permet de modifier les génomes de toutes les cellules vivantes chez les animaux, les humains et les plantes de manière ciblée, simple, rapide et rentable. Il est donc relativement abordable de neutraliser ou de remplacer des gènes et des séquences d'ADN pour ajouter de nouvelles caractéristiques (Debry, 2016).

2. De nouvelles techniques d'amélioration végétale

De nouvelles techniques d'amélioration des plantes se développent rapidement, des progrès dans la recherche génomique permettent des changements précis, ciblés et fiables (Gouache, 2017 ; Lüthi et al., 2016), ils sont différents des OGM, ils ont un potentiel significatif pour l'intensification durable de l'agriculture et de la sécurité alimentaire, ceux-ci comprennent:

2.1. La cisgénèse et l'intragenèse

La cisgénèse et l'intragenèse reposent toutes deux sur l'échange de matériel génétique entre des races de la même espèce ou des espèces qui peuvent naturellement se croiser. La première consiste à introduire le gène entier tel quel. La seconde correspond à l'introduction d'une portion incomplète mais suffisante d'un gène pour altérer l'expression ou la fonction d'un ou plusieurs gènes. Pour la cisgénèse, le gène inséré, les introns associés et les éléments régulateurs sont contigus et inchangés. Dans le cas d'une occurrence intragénique, l'ADN inséré pourrait être une nouvelle combinaison de fragments d'ADN de l'espèce elle-même ou d'espèces compatibles. Les deux approches visent à doter les plantes modifiées de nouveaux traits (Lusser et al., 2011).

2.2. Mutagenèse dirigée par oligonucléotide

L'ODM est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides pour induire des mutations ciblées dans le génome de la plante, généralement d'un ou de quelques nucléotides contigus. Les modifications

génétiques qui peuvent être obtenues avec l'ODM comprennent l'introduction de nouvelles mutations, l'inversion de mutations existantes ou l'induction de courtes délétions.

2.3. Méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN

La Méthylation de l'ADN ARN-dépendante (RdDM) permet aux sélectionneurs de produire des plantes qui ne contiennent pas de séquences d'ADN étrangères et dans lesquelles aucune modification ou mutation n'est effectuée dans la séquence nucléotidique, mais dans laquelle l'expression génique est modifiée par épigénétique. La RdDM induit le silence de gène transcriptionnel (TGS) des gènes ciblés via la méthylation de séquences promotrices.

Le silençage génique par méthylation de l'ADN (« *RNA-dependent DNA methylation* » - RdDM) peut être accompli dans une cellule ou dans un organisme en introduisant un gène qui, une fois transcrit, donne lieu à la formation d'ARN double brin (ARNdb), puis à un petit ARN interférant. Ainsi les chercheurs peuvent moduler l'expression d'un ou plusieurs gènes de manière ciblée par la méthylation des séquences régulatrices sans modifier la séquence nucléotidique elle-même (modification épigénétique) (Bond et Baulcombe, 2015). Les mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN et finalement le silençage du gène a lieu font partie d'un mécanisme complexe et naturel que l'organisme utilise dans la régulation de ses cellules. Cette modification de l'ADN est effectuée par des enzymes particulières appelées « DNA méthyl-transférases ». Les schémas de méthylation de l'ADN peuvent être conservés, cependant, l'effet diminuera au cours des générations suivantes et finira par disparaître, rétablissant l'expression initiale du ou des gènes impliqués (Bond et Baulcombe, 2015)..

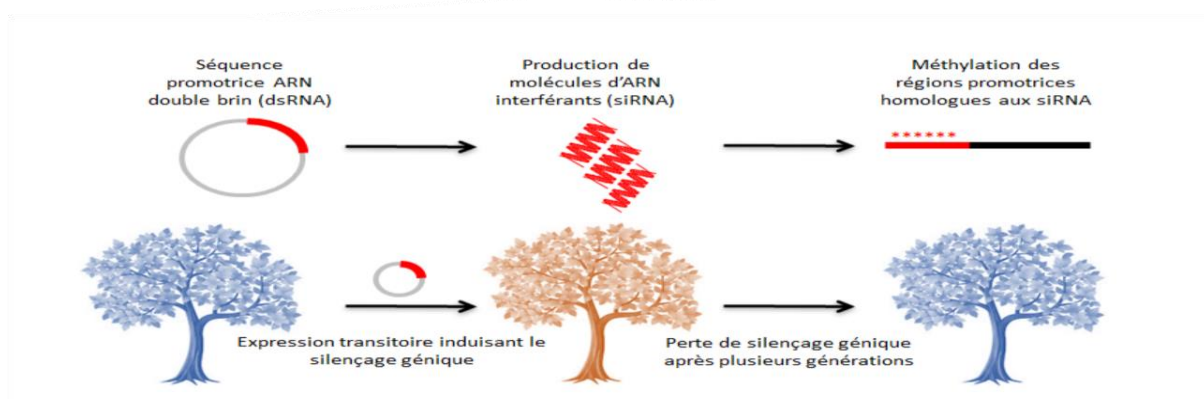


Figure 46. Au cours de la RdDM, les ARN double brin (dsRNA) sont transformés en petits ARN interférants (siRNA) qui guident la méthylation des régions promotrices homologues. (<https://prri.net/fr/scientific-topics/new-breeding-techniques/genome-editing/site-directed-nuclease-sdn-genome-editing/zinc-finger-nucleases-zfn>)

2.4. Agro-infiltration

Les bactéries du genre *Agrobacterium*, et en particulier *A. tumefaciens*, ont la capacité de transférer une partie de leur ADN (appelé ADN-T) dans le noyau des cellules végétales. L'agro-infiltration vise à utiliser cette bactérie comme vecteur de transfert de matériel génétique étranger dans des plantes ou des cellules végétales, de sorte qu'elles puissent être utilisées comme matrices pour le mécanisme de transcription/traduction de la cellule sans nécessiter de réplication ni d'intégration (Chen et al., 2013). Pour effectuer une agro-infiltration, les tissus végétaux sont infiltrés (*in vivo* ou *ex vivo*) avec une suspension liquide d'*Agrobacterium sp.* contenant une construction génétique afin de promouvoir l'expression localisée d'un matériel génétique donné. En pratique, cette technique est utilisée dans un objectif de production de protéines ou de molécules d'intérêt (Leuzinger et al., 2013). Celles-ci sont le plus souvent purifiées après récolte et broyage des tissus de la plante. Les avantages de l'agro-infiltration par rapport à une transformation stable sont la rapidité, la commodité ainsi qu'un niveau d'expression élevé. Dans certaines applications *in vivo*, l'ADN-T peut contenir du matériel de réplication (soit sous forme de génome de virus entièrement fonctionnel, soit sous forme de « réplicons » ne pouvant pas se propager dans la plante) afin d'obtenir l'expression dans des parties de la plante autres que la zone infiltrée ou pour augmenter encore le niveau d'expression. L'agro-infiltration « floral dip » : les fleurs ou inflorescences contenant des cellules germinales sont agro-infiltrées afin d'obtenir une transformation stable de certains embryons pouvant être sélectionnés à l'étape de germination.

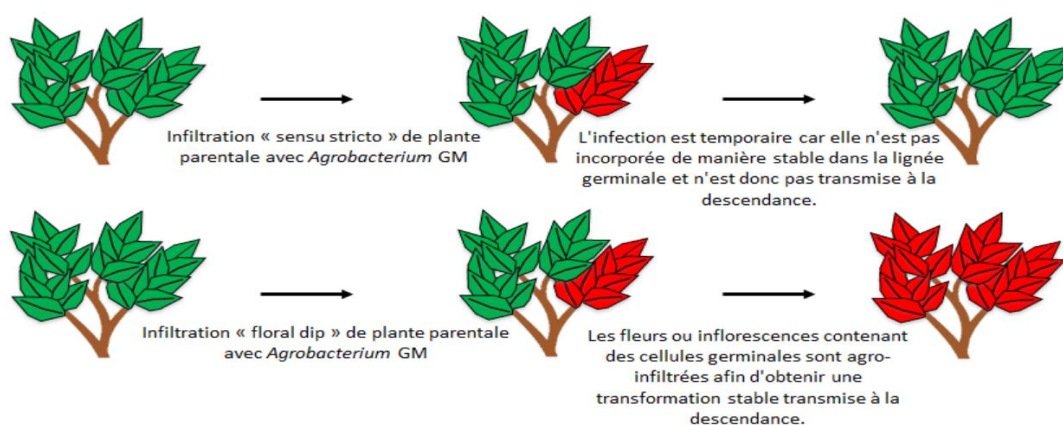


Figure 47. Agro-infiltration « sensu stricto » : les tissus non germinaux (généralement les tissus des feuilles) sont agro-infiltrés afin d'obtenir une expression localisée non transmise à la descendance. (<https://prri.net/fr/scientific-topics/new-breeding-techniques/genome-editing/site-directed-nuclease-sdn-genome-editing/zinc-finger-nucleases-zfn>)

2.5. Sélection inverse

La sélection inverse est une méthode d'inversion de l'ordre des événements conduisant à la production de variétés de plantes hybrides. Cela facilite la production de lignées parentales homozygotes qui, une fois hybridées, restaurent la composition génétique des plantes élités hétérozygotes, sans avoir besoin de rétrocroisement ou de sélection.

2.6. Le greffage sur des porte-greffes génétiquement modifiés

Le greffage est une méthode par laquelle le composant végétal supérieur d'une plante (greffon / scion) est attaché à un composant inférieur enraciné d'une autre plante (porte-greffon) pour produire un organisme chimère avec des caractéristiques de culture améliorées. Il est ainsi possible d'attribuer de nouvelles propriétés au porte-greffe, sans que les fruits de la plante ne contiennent des séquences d'ADN étrangères. Si un greffon GM est greffé sur un porte-greffe non GM, les tiges, les feuilles, les fleurs, les graines et les fruits seront transgéniques (Epinat et al, 2010).

8. Les nucléase ciblées

8.1 Nucléase à doigt de zinc (ZFN)

Les ZFN sont des protéines spécifiquement conçues pour cliver des séquences spécifiques d'acide désoxyribonucléique (ADN). Ils consistent en un domaine « doigt de zinc » (qui reconnaît des séquences d'ADN spécifiques dans le génome de la plante) et une nucléase qui coupe l'ADN double brin. La logique derrière le développement de la technologie ZFN pour la sélection végétale est de créer des outils qui permettent l'introduction de mutations spécifiques au site ou l'intégration spécifique de gènes dans le génome de la plante (Lusser et al., 2011).

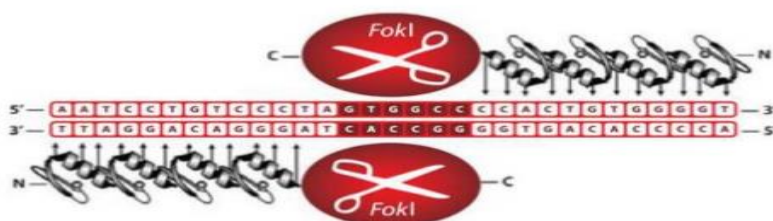


Figure 48. Nucléase à doigt de zinc (ZFN) (<https://prri.net/fr/scientific-topics/new-breeding-techniques/genome-editing/site-directed-nuclease-sdn-genome-editing/zinc-finger-nucleases-zfn>).

8.2. Les méganucléases

Les **méganucléases** sont des endodésoxyribonucléases (nucléases d'ADN) qui se caractérisent par un site de reconnaissance de grande taille (des séquences d'ADN double-brin de 12 à 40 paires de bases), ce qui fait qu'il est généralement présent en un seul exemplaire dans un génome donné. Pour prendre un ordre de grandeur, il faut 20 fois la taille du génome humain pour espérer rencontrer 1 fois la séquence de 18 paires de bases reconnue par la méganucléase I-SceI. Les méganucléases sont donc considérées comme les enzymes de restriction les plus spécifiques. Les méganucléases sont des « ciseaux moléculaires à ADN » que l'on peut utiliser pour remplacer, supprimer ou modifier des séquences de façon extrêmement ciblée. En modifiant leur site de reconnaissance par ingénierie de protéines, on peut modifier la séquence ciblée. Les méganucléases sont employées pour modifier toutes sortes de génomes – bactériens, végétaux, animaux – et ouvrent de larges possibilités d'innovation, notamment en santé humaine (élimination de matériel génétique viral ou « réparation » de gènes altérés) et en agriculture biotechnologique (Epinat et al, 2010).

8.3. Les TALENs

Les Transcription Activator Like-Effectors, sont des enzymes modifiées générées en fusionnant des domaines spécifiques de liaison à l'ADN (successeurs des effecteurs TAL) avec le domaine catalytique de l'enzyme FokI. Les effecteurs TAL sont des protéines sécrétées par le phytopathogène *Xanthomonas* qui se lie à des séquences spécifiques du génome de la plante. Les séquences protéiques des effecteurs TAL diffèrent au niveau de deux acides aminés responsables de la reconnaissance spécifique de nucléotides spécifiques au sein du génome. Les domaines de liaison à l'ADN des TALEN peuvent reconnaître des séquences génomiques d'intérêt. Pour les nucléases à doigts de zinc, le génome est modifié à l'aide de deux TALEN, chacun ciblant une séquence d'ADN de part et d'autre de l'endroit où le clivage est souhaité, réunissant les deux domaines de FokI pour former un seul ADN double brin. (Lusser et al., 2011).

8.4. CRISPR

C'est une nouvelle génération d'outils pour la réparation du génome. Cette méthode s'est développée de façon remarquable ces dernières années. Dans la nature, CRISPR est la base du système immunitaire adaptatif des bactéries et des archées (Gouache, 2017).

➤ L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

1. Découverte de CRISPR

L'histoire du CRISPR commence en 1987, au Japon par le chercheur Atsuo Nakata qui découvre des séquences répétées d'ADN dans le génome de la bactérie *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987).

En 2001, plusieurs chercheurs ont commencé à publier des articles sur ces répétitions. Mais chacun lui a donné un nom différent. SPIDR (répétitions directes à espacement espaceur), STST (répétitions courtes régulièrement espacées) ou LCTR (grandes grappes de répétitions de 20 nucléotides). L'acronyme CRISPR a été choisi en 2002 pour éviter toute confusion.

Les séquences répétées seront baptisées « CRISPR », pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats », ou « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées ». Mais on ne le sait pas encore à cette époque, elles sont en fait des séquences d'ADN de virus que les bactéries ont intégrées à leur propre génome (Mathien, 2016).

Il faudra attendre presque vingt ans après la publication du papier d'Ishino en 1987 pour que l'on s'aperçoive que les spacers dérivent des éléments génétiques étrangers, notamment des phages ou des plasmides (Bolotin et al., 2005 ; Mojica et al., 2005 ; Pourcel et al., 2005).

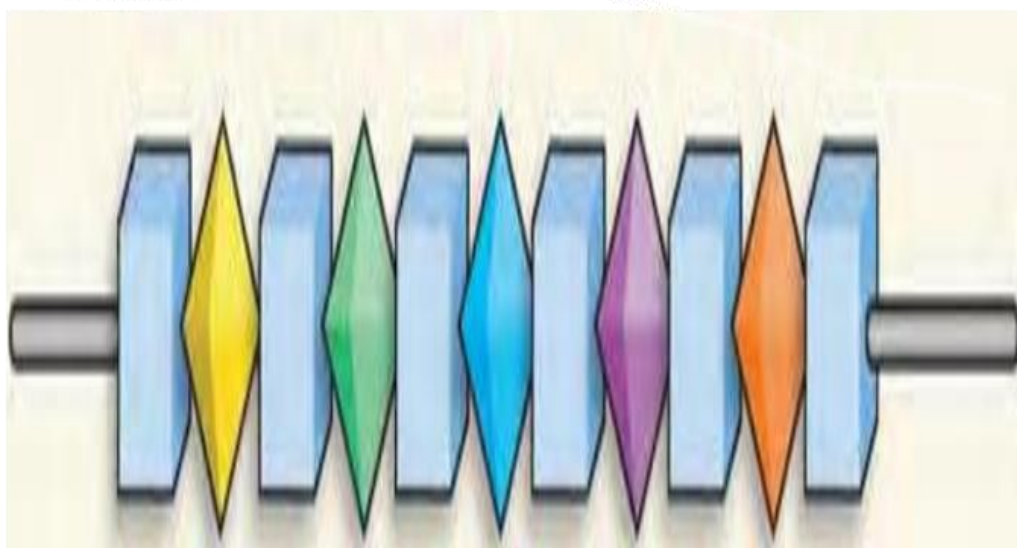


Figure 49. Schéma d'un locus CRISPR. Les cubes bleus représentent les séquences palindromiques similaires répétées ou « repeats » elles sont séparées par les spacers (diamants colorés) qui représentent chacune une séquence différente de longueur proche (Mathien, 2016).

En 2005, trois équipes ont simultanément découvert que les sites CRISPR contenaient des fragments de bactériophages. Cependant, rien ne permet de déterminer la fonction de ces gènes. Mojica et ses collègues ont mené une étude et ont découvert que chez les archées, la présence d'espaces empêchait l'infection par des virus ayant des séquences de gènes similaires (Mojica et al., 2005).

En 2006, ces ADN d'origine virale, issus de bactériophages spécifiques, sont considérés comme un maillon d'un mécanisme de défense bactérien, soit une sorte de « système immunitaire » au niveau de leurs ADN. Les bactéries se servent des CRISPR pour reconnaître et incorporer ces fragments d'ADN exogène lors d'une attaque virale qui est ainsi neutralisée (Debry, 2016).

Entre les années 2007 et 2010, une équipe de Philippe Horvath et Barrangou confirmèrent les résultats de Mojica et ses collaborateurs chez les bactéries en démontrant que, lors d'une infection, des fragments d'ADN phagique peuvent s'intégrer au sein du locus CRISPR, entraînant une résistance vis-à-vis d'autres phages présentant ces séquences (Barrangou et al., 2007).

Dans une étude publiée en 2012 dans science, Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont collaborées leurs deux équipes, et elles ont réussi à élucider une bonne partie du mécanisme par lequel fonctionne le système CRISPR/Cas9. Dès lors, les travaux s'enchaînent avec ce nouvel outil, relativement simple et peu onéreux à mettre en œuvre, avec l'avantage majeur d'éviter le recours à la transgénèse. Il permet d'éditer, de retirer, d'insérer ou de remplacer précisément des segments d'ADN dans un organisme (Jinek et al., 2012 ; Gasiunas et al., 2012).

À ce jour, il n'y a que deux produits modifiés par le génome ont été mis sur le marché. Du soja au profil d'acide gras plus sain est le premier produit commercialisé aux États-Unis (développé à l'aide de la technologie TALEN). Au Japon, une tomate enrichie en acide gamma-aminobutyrique (développée à l'aide de la technique CRISPR) a été mise en vente en septembre 2021. Les scientifiques travaillent sur de nombreuses autres variétés de légumes et de fruits, notamment un champignon de Paris anti-brunissement, des tomates sans pépins, du colza résistant aux herbicides, des pommes de terre extra-féculières, du cacao résistant aux maladies fongiques et virales ainsi que des fraises plus sucrées avec une durée de conservation plus longue (Davis Plüss, 2022).

2. Découverte des gènes Cas

Dès 2002, à l'Université d'Utrecht, Jansen et son équipe firent une découverte qui permettrait de mieux comprendre la biologie des séquences CRISPR. En étudiant leur environnement ils observèrent qu'elles étaient toujours accompagnées par des familles de gènes qui étaient retrouvées seulement si les séquences CRISPRs étaient aussi présentes. Ces gènes seraient appelés Cas, pour CRISPR Associated. Les gènes Cas codent pour des enzymes capables de couper l'ADN de manière très ciblée. La protéine Cas9 agit en ciseau de coupe précise du segment du génome viral. Le locus CRISPR permet la transcription de l'ADN viral incorporé en deux ARN non codants qui servent de guide pour atteindre la cible. L'ARN est utilisé comme une sonde qui sert à reconnaître les virus. Si une infection survient, le virus sera donc reconnu et pourra ensuite être éliminé (Debry, 2016).

En 2002, pour mieux comprendre la biologie des séquences CRISPR Jansen et son équipe de l'Université d'Utrecht découvrent et constatent qu'ils étaient toujours accompagnés d'une famille de gènes qui n'étaient retrouvés que lorsque des séquences CRISPR étaient également présentes. Ces gènes sont appelés Cas pour CRISPR Associated. Le gène cas code pour une enzyme capable de cliver l'ADN de manière très ciblée. La protéine Cas9 agit comme une paire de ciseaux pour couper avec précision des sections du génome viral. Le locus CRISPR permet la transcription de l'ADN viral intégré en deux ARN non codants qui servent de guides pour atteindre la cible. L'ARN est utilisé comme sonde pour détecter les virus. Une fois infecté, le virus peut être reconnu et éliminé (Debry, 2016).

2.1. Découverte du SgRNA

Deux équipes scientifiques, dirigées par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier, se sont lancées dans une collaboration transatlantique pour percer le mystère du fonctionnement de CRISPR-Cas9. Ils ont utilisé du Cas9 recombinant (dérivé de *Streptococcus* et exprimé dans *E. coli*) et deux ARN ont été transcrits *in vitro* (crRNA et tracrRNA). Semblables à Siksny, ils ont montré que Cas9 peut cliver l'ADN purifié *in vitro*, peut être reprogrammé avec des ARNc personnalisés et que les deux domaines de nucléase clivent chacun des fragments opposés. Cependant, l'originalité de leurs travaux réside dans la démonstration que ces deux ARN peuvent fonctionner sous une forme fusionnée *in vitro*. Cet ARN guide unique est appelé ARNg ARN guide unique (Roubin, 2017).

3. Description du système CRISPR/Cas de type II

De nombreuses études ont permis d'identifier différents systèmes CRISPR-Cas, en fonction de l'organisation du locus et de la machinerie protéique nécessaire au clivage de l'ADN exogène. Ces systèmes ont été classés en classes, types et sous-types (Makarova et al., 2009 ; Shmakov et al., 2015). Il s'agit du système CRISPR/Cas de type II choisi par les chercheurs pour sa simplicité pour les applications d'édition d'ADN biotechnologique. Les gènes *cas1* et *cas2* communs à tous les types (Fig. 11A), les locus CRISPR de type II contiennent un gène *cas9* caractéristique qui code pour l'endonucléase homonyme impliquée dans l'acquisition de l'espacement. Les systèmes CRISPR-Cas de type II ont trois sous-types (II-A, II-B et II-C) (Figure 9). La protéine Cas9 dans le type II C est la plus évidente, car elle a tendance à être plus petite que la protéine Cas9 dans les systèmes de type II A et II B.

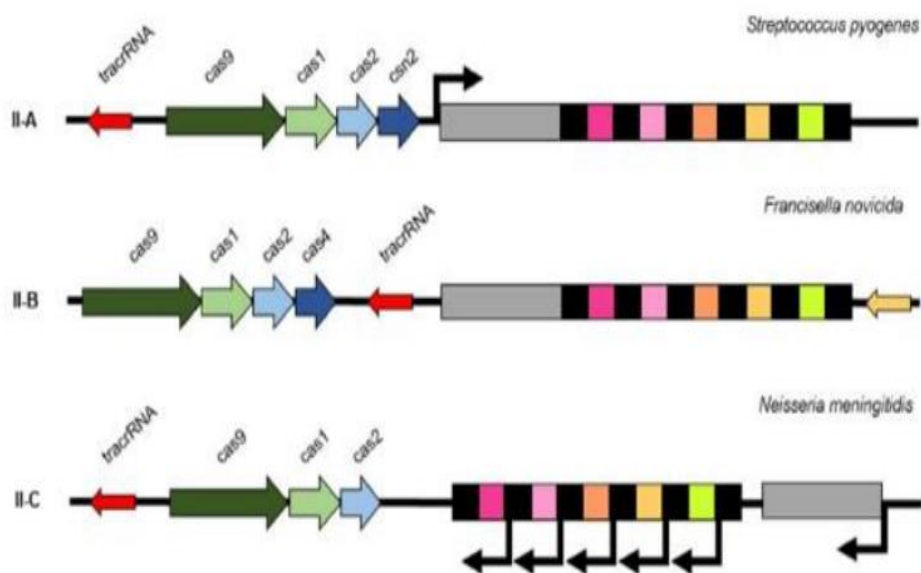


Figure 50. Organisation des systèmes CRISPR/Cas de type II (Guernet, 2017).

4. Principe de la technique CRISPR-Cas9

Le système CRISPR-Cas9 se compose de deux molécules clés qui introduisent des changements (mutations) dans l'ADN.

1. Une enzyme appelée Cas9 ils agissent comme des "ciseaux moléculaires" qui coupent deux brins d'ADN à des endroits spécifiques du génome, permettant d'ajouter ou de retirer des fragments d'ADN.

2. Un morceau d'ARN appelé ARN guide (ARNg) contenu dans un ARN d'échafaudage plus long. La partie échafaudage se lie à l'ADN préfabriqué et la séquence "guide" cas9 vers la partie cible du génome. Cela garantit que l'enzyme Cas9 coupe au bon endroit dans le génome.

La modification ciblée des gènes à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 nécessite l'assemblage informatique d'un segment d'ARN d'au moins 18 à 20 bases correspondant au brin d'ADN utilisé, sa synthèse et son clivage de manière complémentaire (Doudna et Charpentier., 2014). L'ARN guide total et la protéine Cas9 agit comme des ciseaux moléculaires pour couper le génome aux emplacements souhaités (figures 10B et 11C). Cela casse la double hélice et endommage l'ADN, il doit donc être réparé. Si vous souhaitez corriger une séquence d'ADN imparfaitement construite, vous devez ajouter la séquence correcte aux deux éléments précédents. Ceci forme la troisième partie de l'assemblage exécuté. En pratique, il ne doit pas dépasser 100 à 200 nucléotides de longueur. En effet, l'ensemble (ARN guide, Cas9 et séquences de correction) doit être totalement intégré au vecteur pour que l'ensemble pénètre dans les cellules somatiques. La nature les produit spontanément. La plupart sont des virus.

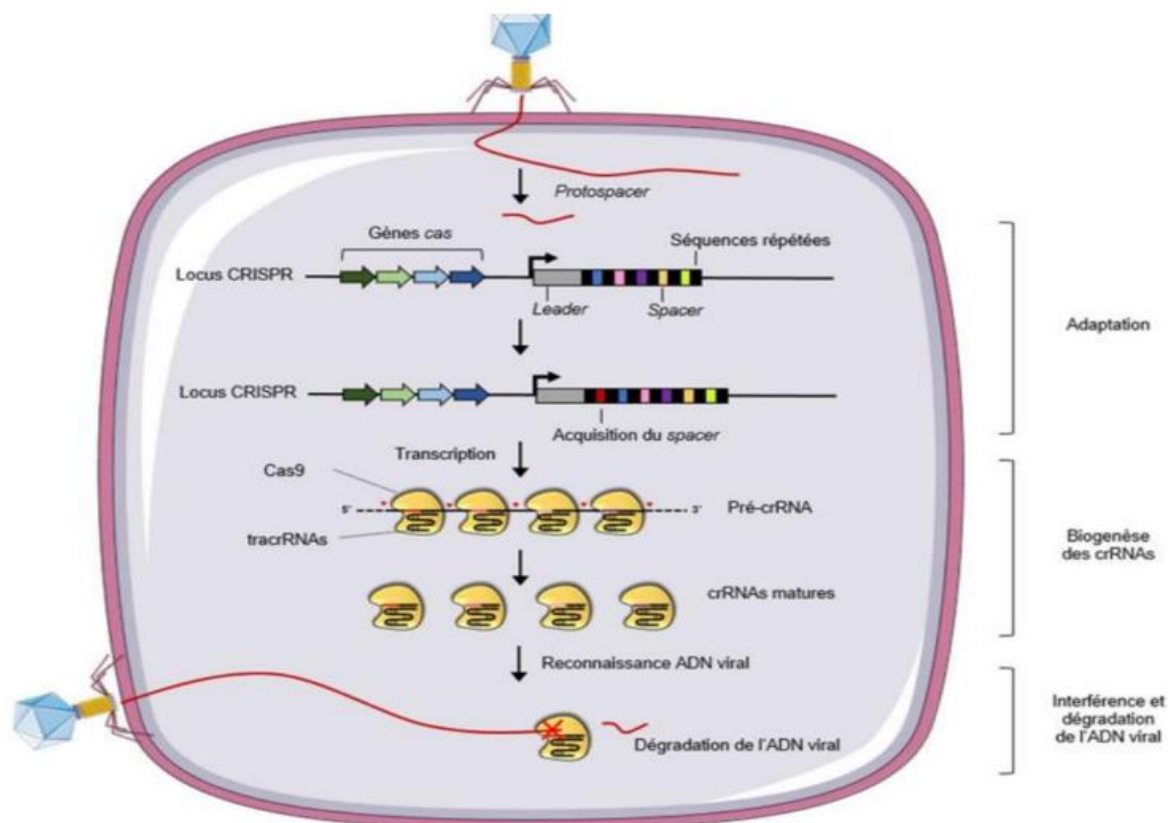


Figure 51. Fonctionnement du système CRISPR/Cas chez la bactérie (Guernet, 2017)

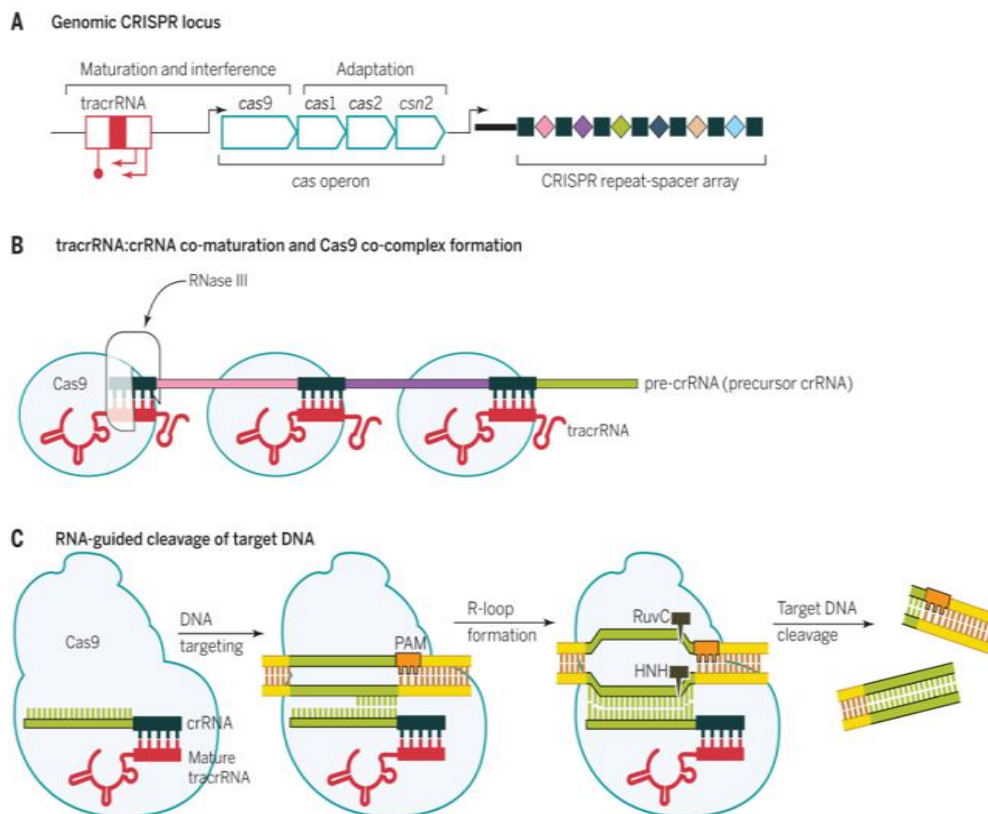


Figure 52. Biologie du système CRISPR-Cas de type II (Doudna et Charpentier., 2014). **(A)** L'opéron du gène *cas* avec l'ARN cible et le réseau CRISPR. **(B)** co-maturation de l'ARN cible et formation de co-complexe Cas9. **(C)** Détails du clivage naturel de l'ADN avec les deux ARN. Dès que le virus retenu est débarrassé des quelques gènes responsables de sa virulence (Figure 51), il reçoit le montage moléculaire réalisé, il est multiplié en culture et les nombreuses copies obtenues sont injectées dans le réseau circulatoire de l'individu à soigner (Doudna et Charpentier., 2014).

6. Applications de la technologie CRISPR-Cas9

6.1. Place de CRISPR-Cas9 dans l'amélioration des plantes

Le système CRISPR-Cas9 est considéré comme plus précis, plus rapide, plus facile à mettre en œuvre et moins cher que toute autre technique d'amélioration génétique des plantes, et a déjà été appliqué à un large éventail d'espèces végétales (Sovová et al., 2016). Une équipe de recherche de l'Académie chinoise des sciences a utilisé les outils CRISPR/Cas9 pour inactiver simultanément différentes copies de gènes de sensibilité au mildiou présents trois fois dans le génome d'une variété de blé, réalisant avec succès un total de six modifications (Gao et al., 2014). La modification simultanée de plusieurs copies de gènes avec CRISPR/Cas9 présente un intérêt particulier car de nombreuses espèces cultivées ont subi des épisodes de duplication du génome et portent plusieurs copies de chaque gène (Jiang et al. al., 2013 ; Ma et al., 2015).

Une équipe a utilisé la technologie CRISPR-Cas9 pour conférer une résistance à l'oïdium du blé (Wang et al., 2014).

En 2014, des chercheurs ont étudié l'activité d'édition de gènes transitoire du système CRISPR-Cas9 dans des protoplastes de tabac et ont transfecté ces protoplastes avec de l'ARN guide (ARNg) et de la nucléase Cas9, suivis d'insertions et de délétions à des fréquences variables. . Ils ont montré que le système CRISPR/Cas9 est un outil utile pour la mutagenèse dirigée du génome de la plante modèle *Nicotiana tabacum* et peut être considéré comme un outil puissant pour l'édition du génome (Gao et al. al., 2014). En 2015, des chercheurs ont utilisé une nucléase spécifique au site (SDN1) du facteur de transcription RIN pour modifier le profil de maturation afin de prolonger la durée de conservation des tomates (Figure 14) (Ito et al., 2015)).

En 2016, le chercheur Shi et son équipe ont utilisé CRISPR-Cas9 pour augmenter le rendement dans des conditions de stress hydrique chez le maïs en remplaçant le promoteur du gène ARGOS8 par GDS2 PRO en utilisant SDN2 (Fig. 15) (Shi et al., 2017). Le chercheur Liang et ses collaborateurs de la Chinese Academy of sciences décrivent dans Nature Communications une méthode efficace et spécifique d'édition du génome des cultures de monocotylédones importantes (*Triticum aestivum* L.). Ils ont pu obtenir des mutants à partir de plantes transgéniques. Bien que la régénération de plantes à partir de protoplastes monocotylédones reste techniquement difficile, les chercheurs pensent que les méthodes d'édition du génome peuvent être appliquées pour produire d'autres plantes à génome modifié (Liang et al., 2017).

Une équipe de chercheurs de l'Université Purdue et de l'Académie chinoise des sciences a publié un article le 21 mai 2018 intitulé « Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity ». Une équipe dirigée par Jian-Kang Zhu a utilisé la technologie d'édition de gènes CRISPR/Cas9 pour introduire des mutations dans 13 gènes liés à l'acide abscissique, phytohormone. Cet acide abscissique est connu pour être impliqué dans la tolérance des plantes au stress et à l'inhibition de la croissance. Dans deux tests distincts, les chercheurs ont découvert que les cultures GM produisaient 25 % et 31 % de grains en plus que les variétés de riz sauvage (Miao et al., 2018).

6.2. Orientations prospectives des systèmes de ciblage d'ARN CRISPR/Cas13 dans les plantes

La technologie CRISPR/Cas est devenue un puissant outil d'édition du génome en raison de ses applications dans divers domaines pour les altérations génétiques, le diagnostic des maladies et l'amélioration des cultures. Au cours de la dernière décennie, le système CRISPR/Cas9 ciblant

L'ADN est devenu un outil remarquable pour sa mise en œuvre dans diverses technologies d'ADN telles que l'inactivation de gènes, l'activation de gènes, l'édition de gènes, la thérapie génique et la détection d'ADN dans plusieurs organismes. La découverte récente des systèmes de ciblage d'ARN CRISPR/Cas13 contribue à l'avancement des technologies d'ARN existantes et est devenue un outil prometteur applicable à divers organismes. Cependant, les études récentes sur les systèmes CRISPR/Cas13 chez les plantes se sont principalement concentrées sur l'interférence de l'ARN viral. L'inactivation médiée par Cas13 de l'ARNm endogène a été démontrée dans quelques études, ciblant des gènes connus comme preuve de concept pouvant être appliquée pour cibler l'ARNm de gènes végétaux sensibles aux maladies ou étudier la fonction de gènes inconnus à travers knockdown transitoire sans perturber la séquence d'ADN.

De plus, le ciblage des ARN non codants tels que les longs ARN non codants, les microARN et les ARN circulaires dans les plantes à l'aide de CRISPR/Cas13 peut devenir un outil prometteur pour étudier leur rôle dans les plantes. Auparavant, le ciblage de l'ARN non codant dans les plantes était effectué à l'aide de CRISPR/Cas9 au niveau de l'ADN pour trouver leurs rôles dans la croissance, le développement et les réponses au stress des plantes. De même, CRISPR/Cas13 peut également être utilisé pour cibler l'ARN non codant dans les plantes au niveau de l'ARN, favorisant ainsi la résistance des plantes sans altérer le génome. Dans un passé récent, l'édition de bases chez les plantes a été réalisée à l'aide d'un Cas9 altéré (nCas9 ou dCas9) pour apporter des modifications de base unique (C à T ou T à A) dans le génome. De même, l'édition de bases d'ARN peut être effectuée via des outils REPAIR et RESCUE qui utilisent dCas13 fusionné avec des enzymes désaminase provoquant des conversions A en G et C en U. Cependant, des questions ont été soulevées concernant les défis liés à la stabilité de l'expression des éditeurs de base CRISPR et à l'identification des variations phénotypiques causées par les changements de base dans le transcrit d'ARN dans des revues récentes sur l'édition de base utilisant CRISPR/Cas13 chez les plantes. Par conséquent, davantage de recherches sur l'édition d'ARN dans les plantes utilisant CRISPR/Cas13 sont nécessaires pour son application dans l'amélioration future des cultures (Kavuri et al, 2022).



Figure 53. Modifications des profils de maturation de la tomate. Tomate modifiée (à gauche), tomate naturelle (à droite) (Ito et al., 2015).

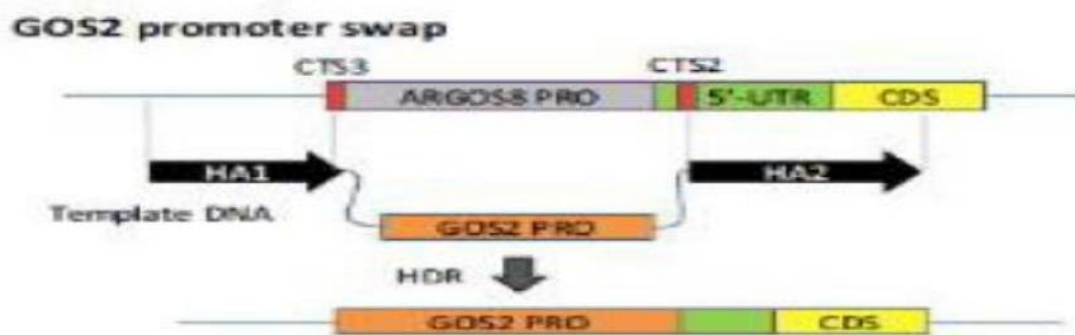


Figure 54. SDN2 sur le promoteur de gène responsable de rendement en cas de stress hydrique chez le maïs (Shi et al., 2016)

Références bibliographique

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D A, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709–1712
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich S D (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl* 151: 2551–2561.
- Bond DM & Baulcombe DC (2015) Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(3):917-922.
- Chen Q, *et al.* (2013) Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med* 1.
- Davis Plüss J '(2022) Cinq choses à savoir sur l'édition génomique des plantes. <https://www.swissinfo.ch/fre/cinq-choses-%C3%A0-savoir-sur-l-%C3%A9dition-g%C3%A9nomique-des-plantes/47313820>
- Debry J M (2016) CRISPR–CAS 9 : quand l'arlésienne refait surface ou le retour de la thérapie génique – devenue correctrice – à l'avant-scène. Dossier de l'Institut Européen de Bioéthique. p 1-4
- Doudna A J, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci* 109: 2579–2586
- Epinat JC, Thomas S, Duclert A, Rolland S, Pâques F, and Duchateau P. (2010) Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domain derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Research*. 38(6): 2006–2018.
- Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X, Wu Y, Zhao P, Xia Q (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Springer Science+Business Media Dordrecht. Plant Mol Biol* 87:99–110.
- Gouache C (2017) Les nouvelles techniques d'amélioration des plantes : quelques éclairages du quatrième semencier mondial, Limagrain, sur l'innovation en agriculture. *Réalités industrielles*, p 35-37.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12): 5429-5433
- Ito Y, Nishizawa-yokoi A, Endo M, Mikami M (2015) Biochemical and Biophysical Research Communications CRISPR / Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1–7p.
- Jean-Yves M, Procaccia C (2017) La révolution de la modification ciblée du génome (genome editing). Rapport sur les enjeux économiques, environnementaux, sanitaires et éthiques des biotechnologies à la lumière des nouvelles pistes de recherche. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques Et technologiques, République Française.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks D P (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41: 188p ;

- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821.
- Kavuri, Naga Rajitha, Manikandan Ramasamy, Yiping Qi et Kranthi Mandadi. 2022. "Applications de l'édition d'ARN basée sur CRISPR/Cas13 dans les plantes" *Cellules* 11, no. 17 : 2665. <https://doi.org/10.3390/cells11172665>
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang, Wang Y, Zhao Q, et al. (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes *Nature Communications* 8 (4261).
- Leuzinger K, *et al.* (2013) Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J Vis Exp* (77).
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2011) New plant breeding techniques. State of the art and prospects for commercial development. *EUR* 24760, 23-27p
- Ma Y, Zhang X, Shen B, Lu Y, Chen W, Ma J, Bai L, Huang X, Zhang L (2014) Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 24: 122–125.
- Makarova K S, Wolf Y I, Van D O, Koonin E V (2015) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biology Direct* 4: 29p.
- Mathien S (2016) CRISPR : Une révolution génétique à portée de main. Programme de doctorat en biologie moléculaire. DIRE / Ficsum 25 (2).
- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X et al. (2013) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res* 23: 1233–1236.
- Mojica, F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol* 60: 174–182
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiol. Read. Engl* 151: 653–663.
- Roublin J B (2017) CRISPR/Cas9 : HISTOIRE, METHODE, POTENTIEL & IMPACT. Thèse de doctorat. Soutenue le 24 Mars 2017.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., ... & Habben, J. E. (2017). ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 207-216.
- Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, Wolf Y I, Gootenberg J S et al. (2015) Discovery and Functional Characterization of Diverse Classe 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell* 60: 385-397.
- Sovová T, Kerins G, Demnerova K, Ovesna J (2016) Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants : State of the Art in the Research Pipeline. *Curr. Issues Mol. Biol* 21: 41–62.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol*, 1-6p.



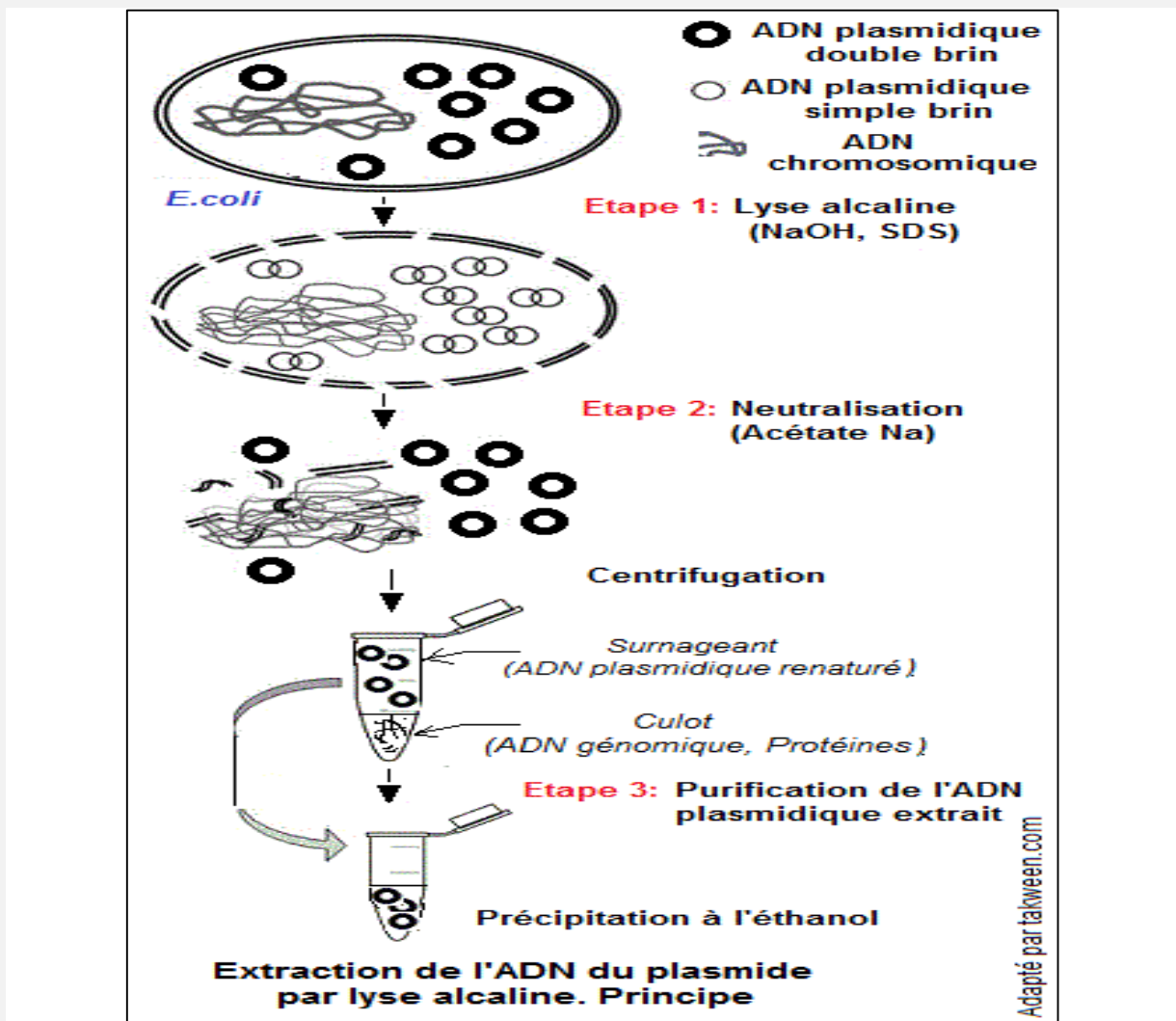
Travaux dirigés (TD)

Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1
TD N°1 et N°2

Exercice 01

Interprétation de l'extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline :

Les techniques les plus courantes de l'extraction et la purification de l'ADN **des plasmides** par lyse alcaline ont des noms abrégés selon 'miniprep', 'midiprep' et 'maxiprep' (selon le volume de la culture bactérienne). Le but consiste à faire une extraction rapide de l'ADN du plasmide (ADN plasmidique) afin de faire une analyse par digestion *via* les **enzymes de restriction** et la séparation par **électrophorèse**. Les digestions servent à vérifier un clone et/ou établir une **carte de restriction**. Expliquer les différentes étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique par **lyse alcaline** comme résumée dans la figure ci-contre.



Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1

Exercice 02**Analyse de ligation/ transformation / Etalement**

Voici les résultats obtenus par 4 binômes suite à des ligations, des transformations et étalements sur boîtes LB+ ampicilline.

ADN transformés	Binôme 1 (Nb colonies)	Binôme 2 (Nb colonies)	Binôme 3 (Nb colonies)	Binôme 4 (Nb colonies)
Aucun	0	0	0	3 (jaune)
100pg PSK Super-enroulé	250	500	500	400
Vecteur double digéré+ ligase	0	0	60 bleues	130 bleues
Vecteur double digéré+ insert	0	0	55 bleues	0
Vecteur double digéré+ insert + ligase	2 bleues 90 blanches	0	54 bleues 2 jaunes	115 bleues 20 blanches

a. Analysez et commentez chacun des résultats.

Exercice 03

Un fragment d'ADN linéaire coupé par l'enzyme EcoRI donne deux fragments de 3Kb, 3,5Kb. Lorsqu'il est coupé par l'enzyme Hind II donne deux fragments de 2 Kb et de 4,5 Kb. La double digestion produit 3 fragments de 2 Kb, 1 Kb, 3,5 Kb. **Donnez la carte de restriction de ce fragment d'ADN**

Exercice 04

Un plasmide recombinant contenant un gène X est digéré par les enzymes de restriction BamHI et Eco RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur un gel d'agarose, on obtient les profils de restriction suivants :

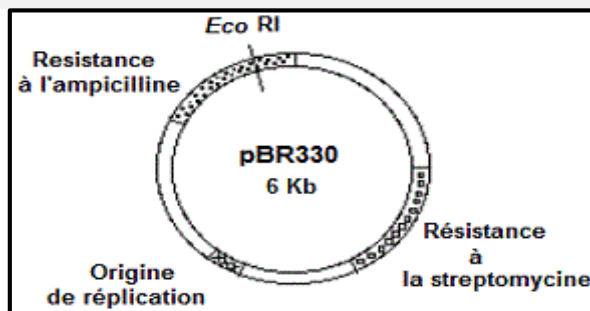
Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1

BamHI	Eco RI	BamHI + Eco RI
5,1 kb —	6,5 kb —	1,9 kb —
5,4 kb —	1,8 Kb —	4,6 Kb —
3,5 kb —	5,7 kb —	0,8 kb —
		1 Kb —
		3,2 Kb —
		2,5 Kb —

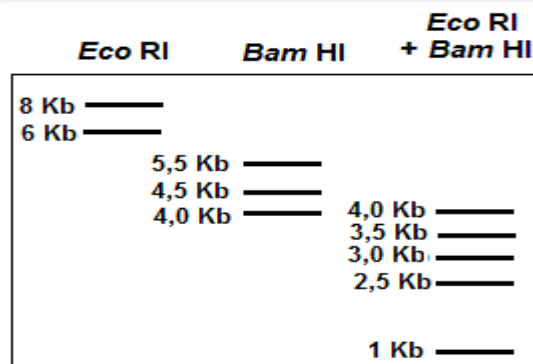
Donnez la carte de restriction du plasmide.

Exercice 05

Clonage et analyse de l'ADN recombinant. On souhaite étudier la fonctionnalité d'un gène M d'une bactérie. Pour cela, on essaie de cloner au site *EcoRI* du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment *EcoRI*-*EcoRI* d'ADN génomique de la bactérie d'intérêt.



- Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones recombinants.
- Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *BamHI* et *EcoRI*. Après migration et séparation des fragments d'ADN par électrophorèses sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction ci contre.
- Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.



Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1

Solutions des exercices

Exercice 1

- **Interprétation de l'extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline :**

- **Etape 1 :**

- Lyse des cellules par le détergent (SDS) en présence de soude (pH 13) dénaturant l'ADN total (plasmide + Chromosome).

- **Etape 2 :**

- Neutralisation rapide par addition de l'acétate de potassium (pH 5,5): L'ADN plasmidique se renature tandis que l'ADN chromosomique précipite.
- Concentration de l'ADN plasmidique par précipitation à l'alcool et récupération de l'ADN par centrifugation.

- **Etape 3 :**

- Suspension de l'ADN plasmidique dans le tampon TE ou l'eau pure.
- Elimination des ARN par les RNases (hydrolyse sélective des ARN/ ADN reste intact).

Exercice 2

Analyse et commentaire de chacun des résultats :

Boîte 1 : Aucun : Représente la boîte témoin, les binômes 1,2 et 3 non rien et c'est le résultat attendu c'est-à-dire pas de contamination sur leurs biotes tandis que le binôme 4 a eu trois colonies Jaunes (contamination) qui est dû à une mauvaise manipulation.

Boîte 2 : 100 psk super enroulé : 250 -500-500-400 c'est les bactéries résistantes ensemencées sur les biotes qui contient le milieu LB. Les binômes 2 et 3 ont eu une bonne résistance de bactérie.

Boîte 3 : vecteur double digéré + ligase : les binômes 1 et 2 : les vecteurs ne sont pas ligaturé

Boîte 4 : vecteur double digéré + insert : le binôme 3 : les colonies bleues : veut dire que les vecteurs ont échappé à la digestion. Par contre les autres binômes ont eu le résultat attendu c'est-à-dire 0 colonie.

Boîte 5 : vecteur double digéré + insert + ligase : Les binômes 1 et 4 ont réussi leur clonage (90 Blanches, 20 Blanches respectivement).

Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1

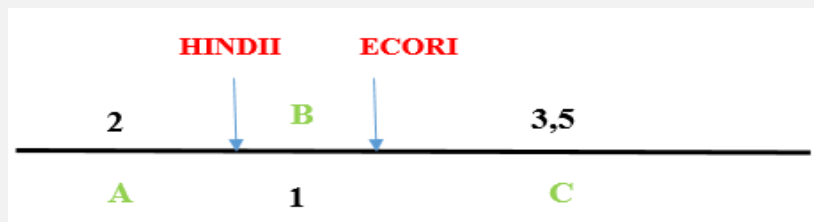
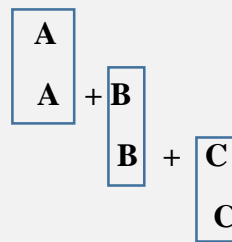
Le binôme 2 : N'ont pas réussi leur clonage.

Le binôme 3 : N'ont pas réussi leur clonage et en plus ils ont des contaminations (couleur Jaune).

Exercice 3

ECORI : 3 Kb 3,5 Kb
HINDII : 2 Kb 4,5 Kb
ECORI/ HINDII : 2 Kb 1 Kb 3,5 Kb
A B C

ECORI	HINDII
3= A+B	2=A
3,5= C	4,5= B+C

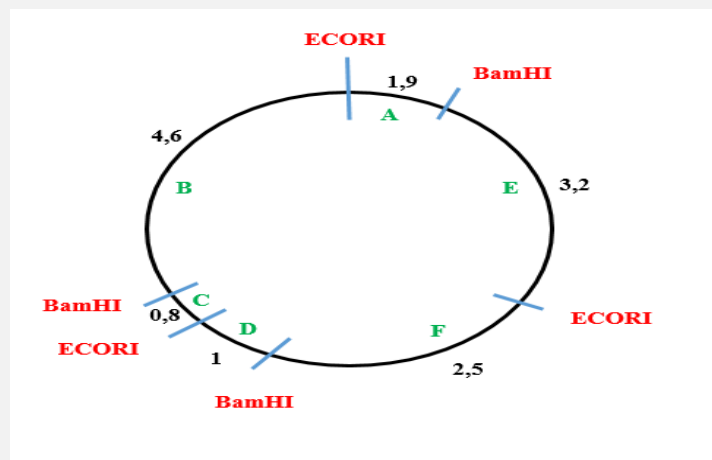
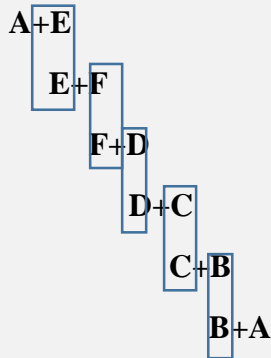


Exercice 4

BamHI : 5,1 Kb 5,4 Kb 3,5 Kb
ECORI : 6,5 Kb 1,8 Kb 5,7 Kb
BamHI / ECORI : 1,9 Kb 4,6 Kb 0,8 Kb 1 Kb 3,2 Kb 2,5 Kb
A B C D E F

BamHI	ECORI
5,1= A+E	6,5=A+B
5,4= B+C	1,8= D+C
3,5= D+F	5,7= E+D

Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1



Exercice 5

a. Protocole de clonage

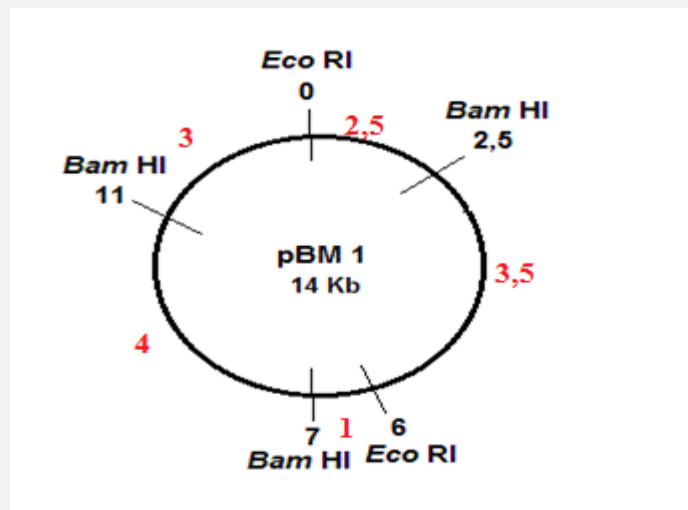
1. **Préparation de l'insert** : Extraction d'ADN génomique de la bactérie.
2. **Digestion** partielle de cet ADN par l'enzyme de restriction *Eco RI*, de manière à générer des fragments de 5 à 10 kb.
3. **Electrophorèse** préparative pour purifier sur gel les fragments de 5 à 10 kb
4. **Préparation du vecteur** : Digestion complète de pBR330 par *Eco RI*. Déphosphorylation des extrémités.
5. **Clonage** : ligature des inserts et des vecteurs. Transformation de cellules d'*E. coli*. Recommencer les étapes précédentes jusqu'à avoir 10^{+6} colonies transformées indépendantes.
6. **Sélection** : sélection des colonies transformées sur milieu contenant de la streptomycine. Pour estimer le taux de colonies qui ont reçu un plasmide contenant de l'ADN génomique de la bactérie étudiée, repiquage d'environ 500 colonies sur milieu

Département du cycle ingénieur
5^{ème} année semestre 1

contenant de l'ampicilline : seules les colonies qui ont reçu un plasmide ne contenant pas d'ADN génomique de la bactérie étudiée poussent.

- 7. Sélection des clones contenant le gène d'intérêt :** transfert des 10^{+6} colonies sur filtre et hybridation moléculaire avec une sonde appropriée (technique dite de 'hybridation sur colonies')

b. La carte de restriction :



TD : Analyse d'article scientifique

- + Les étudiants seront répartis en binômes.
- + A chaque binôme sera attribué un article scientifique en anglais sur les techniques de transfert d'ADN et amélioration des plantes.
- + Les étudiants devront analyser les articles scientifiques afin d'effectuer des résumés et les exposant en quelques diapos.
- + le temps imparti pour chaque binôme pour présenter est de 10 à 15 minutes maximum en abordant :
 - ✓ L'objectif de l'article
 - ✓ La problématique
 - ✓ Les résultats et discussions

NB : les présentations peuvent se faire en anglais ou en français selon la maîtrise de la langue.