

Chapitre III :

La transgénèse véaétale

Chapitre III : La transgénèse végétale

Introduction :

Chapitre III : La transgénèse végétale

« La biotechnologie est probablement la science la plus ancienne : depuis des temps immémoriaux, l'homme a produit de l'alcool ou du fromage, utilisé des drogues hallucinogènes et sélectionné des plantes ».

K.W. Fuller, J.R. Gallon (1985)

L'utilisation des techniques biotechnologiques traditionnelles a été orientée vers la production alimentaire. Depuis des siècles, l'homme a appris à sélectionner des espèces comestibles, afin d'augmenter leur rendement et améliorer leur qualité. La sélection végétale a été utilisée pour produire des variétés nouvelles et meilleures. Les premiers hommes ont utilisé les plantes à d'autres fins. Au début ce fut pour se chauffer et se vêtir, puis le temps passant, les végétaux ont servi de colorants, d'herbes, d'épices, de drogues, de parfums, de gomme, d'essences, d'huiles, de cires ainsi que de toutes sortes d'autres produits. Rien que le maïs (*Zea mays*) est cultivé à la fois comme source de matériau destiné à l'industrie mais également comme aliment pour le bétail et l'homme. Les amidons et les huiles de maïs sont utilisés de mille façons par l'industrie pour fabriquer des produits aussi variés que les crèmes glacées, les colles, le plastique, des produits pharmaceutiques, des peintures et des cosmétiques.

1) Les méthodes des biotechnologies végétales

Les biotechnologies représentent simplement l'application de méthodes scientifiques visant à manipuler des cellules vivantes ou des organismes.

3- La mise au point des plantes Bt comme exemple d'application des biotechnologies aux plantes :

Depuis que l'homme cultive les plantes pour se nourrir, il est en compétition avec d'autres animaux, principalement les insectes. Les effets délétères des insectes sur la productivité agricole sont significatifs. Par exemple, l'application de pesticides contre le doryphore de la pomme de terre et les pertes de productivité liées à cet insecte coûtent entre 15 et 30 millions d'euros par an aux cultivateurs aux États-Unis. La pyrale du maïs, un autre insecte ravageur, peut détruire des champs entiers de maïs en creusant des galeries dans les feuilles et en consommant les grains. Cet insecte inocule aussi aux plantes des spores d'un champignon pathogène, les forçant à lutter à la fois contre un insecte et contre une infestation fongique. Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, près de la moitié des pertes de cultures chaque année sont dues aux insectes, aux maladies et aux mauvaises herbes. Les pertes les plus importantes ont lieu dans les pays en voie de développement qui ne peuvent généralement pas s'offrir d'insecticides, d'herbicides, ni de variétés résistantes de plantes cultivées.

Le maïs contenant des gènes Bt est à présent largement cultivé aux États-Unis où il donne d'excellents résultats. Cependant, cette nouvelle forme d'agriculture n'est pas sans problèmes. Par exemple, des insectes peuvent développer une résistance à l'égard des toxines Bt. Même si le développement d'une résistance peut être significativement retardé lorsque de 5 à 10 % de la culture contient du maïs non porteur du gène Bt, la durée d'efficacité des cultures Bt peut être limitée. Une autre difficulté potentielle concerne l'action des toxines Bt sur la destruction involontaire d'insectes inoffensifs pour les plantes. Les premières expériences ont montré que les chenilles du monarque peuvent être tuées par du pollen de maïs Bt si ce pollen tombe sur les feuilles d'asclépiade, leur nourriture préférée. Toutefois, d'autres expériences ont montré que les chenilles du monarque évitent généralement les

feuilles recouvertes de pollen. De plus, l'alimentation des chenilles ne coïncide habituellement pas avec la libération du pollen de maïs. Dès lors que le maïs Bt permet de réduire l'utilisation de pesticides pouvant se répandre dans les zones aux alentours, il peut avoir des effets bénéfiques sur les monarques et autres insectes inoffensifs présents dans ces zones.

La mise au point des plantes Bt n'est qu'un exemple d'application des biotechnologies aux plantes pour accroître la production alimentaire et améliorer la santé humaine. Dans ce chapitre, nous étudierons les méthodes utilisées dans les biotechnologies végétales, dont beaucoup sont actuellement en pleine évolution, puis nous examinerons leurs principales applications et potentialités.



Doryphore



Chenilles de la pyrale du maïs

3.1. Les gènes peuvent être transférés d'une espèce à l'autre grâce au génie génétique

Comme tous les êtres vivants stockent l'information génétique sous la forme d'ADN et que l'ADN possède une même structure quel que soit l'organisme, des gènes peuvent être transférés d'un organisme à n'importe quel autre. Le génie génétique dispose de méthodes permettant d'identifier, d'isoler et de transférer rapidement des gènes d'un organisme à l'autre au moyen de techniques moléculaires. Le produit d'un tel transfert de gènes constitue un organisme transgénique. Si, une fois transféré, un gène s'exprime, il produira la même protéine dans l'organisme transgénique que celle qu'il produisait dans l'organisme d'origine. Ainsi, les plantes transgéniques contenant le gène Bt produisent les toxines Bt, tout comme le font les bactéries *B. thuringiensis*. Grâce au génie génétique, il est ainsi possible d'introduire un gène d'éléphant dans un chou ou un gène de luciole dans un plant de tabac (voir figure 3.1).

Certes, depuis des milliers d'années, les cultivateurs ont contribué à échanger des allèles entre individus de la même espèce, ou entre espèces étroitement liées, par le biais de méthodes traditionnelles d'amélioration des plantes. Par exemple, ils ont pu croiser une lignée de blé produisant une bonne farine mais peu tolérante à la sécheresse, avec une lignée produisant une farine médiocre mais supportant la sécheresse, l'objectif étant de produire une nouvelle lignée possédant les meilleures caractéristiques de chacune des deux lignées parentales. La descendance F1 d'un tel croisement est hétérozygote, ce qui signifie qu'elle possède une copie des allèles conférant l'un et l'autre des traits bénéfiques.



FIGURE 3.1 : Un gène animal dans le génome d'une plante.

Le génie génétique permet au contraire de transférer rapidement des allèles spécifiques, voire de nouveaux gènes, dans les plantes. Le temps nécessaire à l'obtention de nouvelles variétés de plantes d'intérêt peut ainsi être réduit de plusieurs années. En outre, comme nous l'avons mentionné précédemment, le génie génétique permet d'intégrer dans les plantes des gènes provenant de toutes sortes d'organismes, ce que la nature ne pourrait jamais réaliser par de simples croisements.

La figure 3.2 donne les grandes lignes d'une procédure couramment utilisée pour introduire de nouveaux gènes dans les plantes. Pour ces dernières, la plupart des applications du génie génétique utilisent le plasmide Ti et comprennent quatre étapes élémentaires :

- 1- Les plasmides Ti sont isolés à partir d'une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*.
- 2- Ces plasmides sont mis en présence d'ADN provenant d'un autre organisme et le gène d'intérêt contenu dans cet ADN est inséré dans les plasmides.
- 3- Un segment de l'ADN plasmidique contenant le gène étranger est alors incorporé aux chromosomes des cellules.
- 4- Des plantes entières sont régénérées à partir de ces cellules. Plus loin dans ce chapitre, nous examinerons plus en détail les étapes de cette procédure et nous exposerons brièvement un petit nombre de variantes.

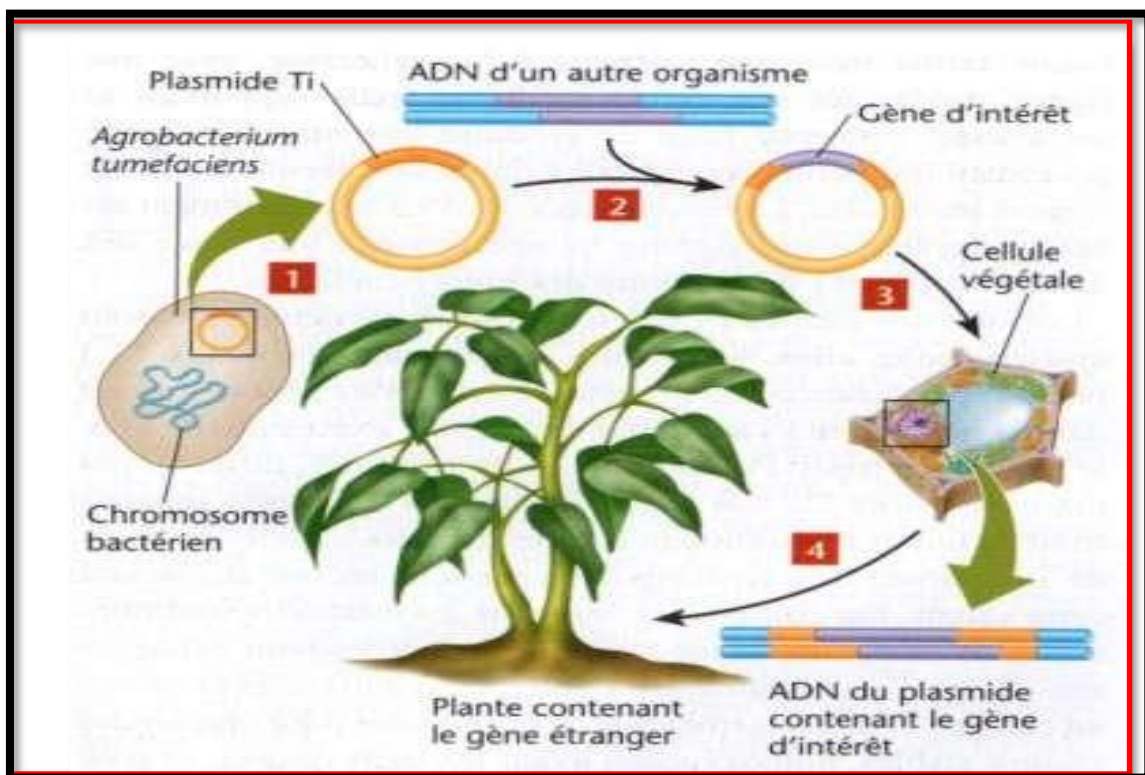


FIGURE 3.2 : Grandes lignes du génie génétique chez les plantes

3-3- Les plasmides servent souvent de vecteurs au transfert de gènes chez les plantes

Une application du génie génétique commence habituellement par le choix d'un **vecteur**, lequel représente un agent permettant le transfert d'un gène d'un organisme à l'autre. Le vecteur le plus fréquemment utilisé chez les plantes est un plasmide contenu dans une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet. **Les plasmides** sont des molécules d'ADN circulaires, autorépliquatives, de plus petite taille que le chromosome bactérien dont elles sont séparées. Le plasmide contenu dans *A. tumefaciens* est le plasmide Ti (*Tumor inducing*) ; comme l'indique son nom, il joue un rôle clé dans la formation de tumeurs chez les plantes infectées.

Les plasmides ne sont pas les seuls vecteurs capables de transférer des gènes aux plantes. Le virus de la mosaïque du tabac et celui de la mosaïque du chou-fleur sont deux exemples de virus utilisés à cette fin. En outre, l'ADN du virus de la mosaïque du chou-fleur contient un promoteur très actif, qui est souvent intégré dans d'autres vecteurs afin d'accélérer la transcription des gènes qu'ils contiennent. Des chromosomes artificiels peuvent aussi servir de vecteurs. Les scientifiques fabriquent de tels chromosomes à partir d'un ADN contenant un site de fixation de l'ADN polymérase (qui permet aux chromosomes de se répliquer), un centromère (qui permet aux chromosomes de participer à la division cellulaire) et d'un gène étranger destiné à être transféré. Des chromosomes artificiels de bactéries (BAC) et de levures (YAC) ont ainsi été générés.

3.2. Les enzymes de restriction et l'ADN ligase sont utilisés pour fabriquer de l'ADN

recombinant

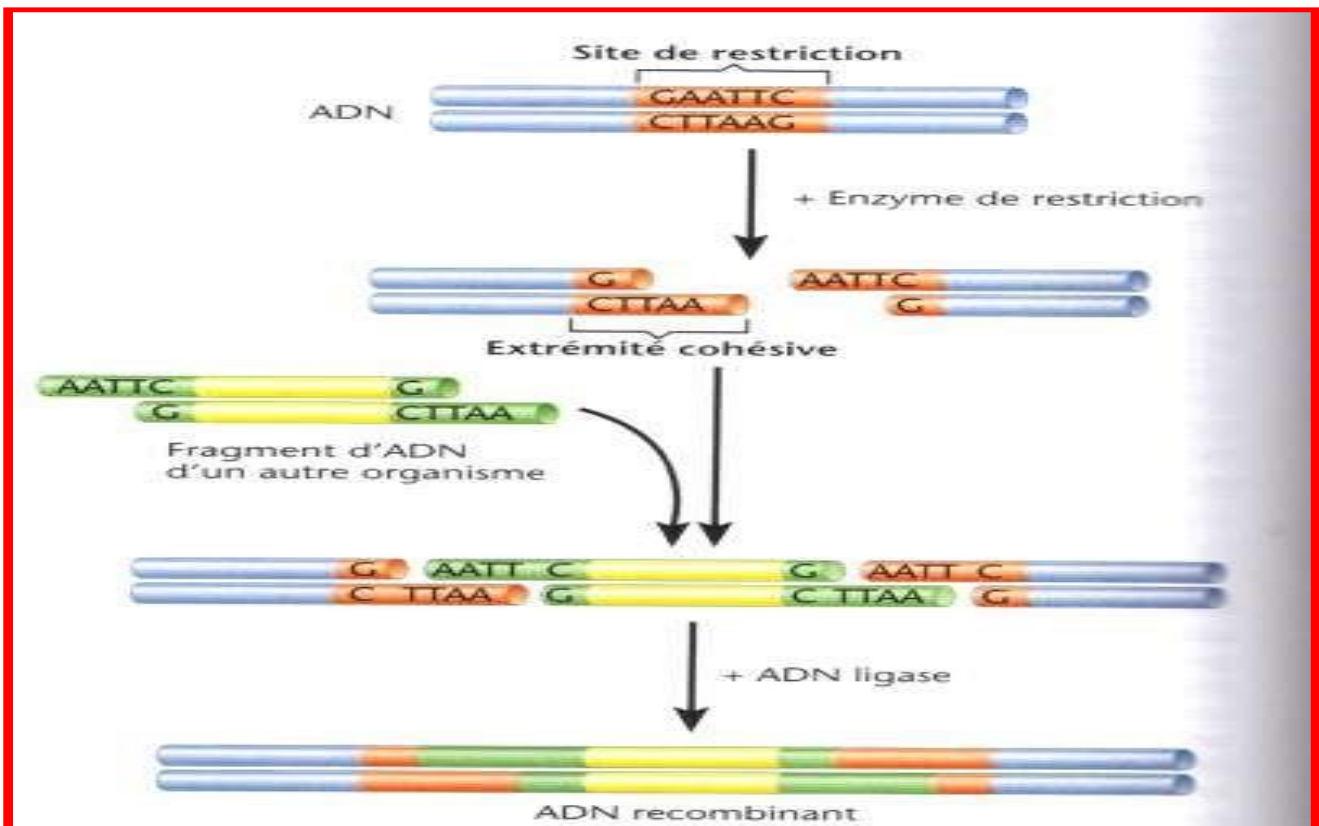


FIGURE 3.3 : Fabrication d'un ADN recombinant.

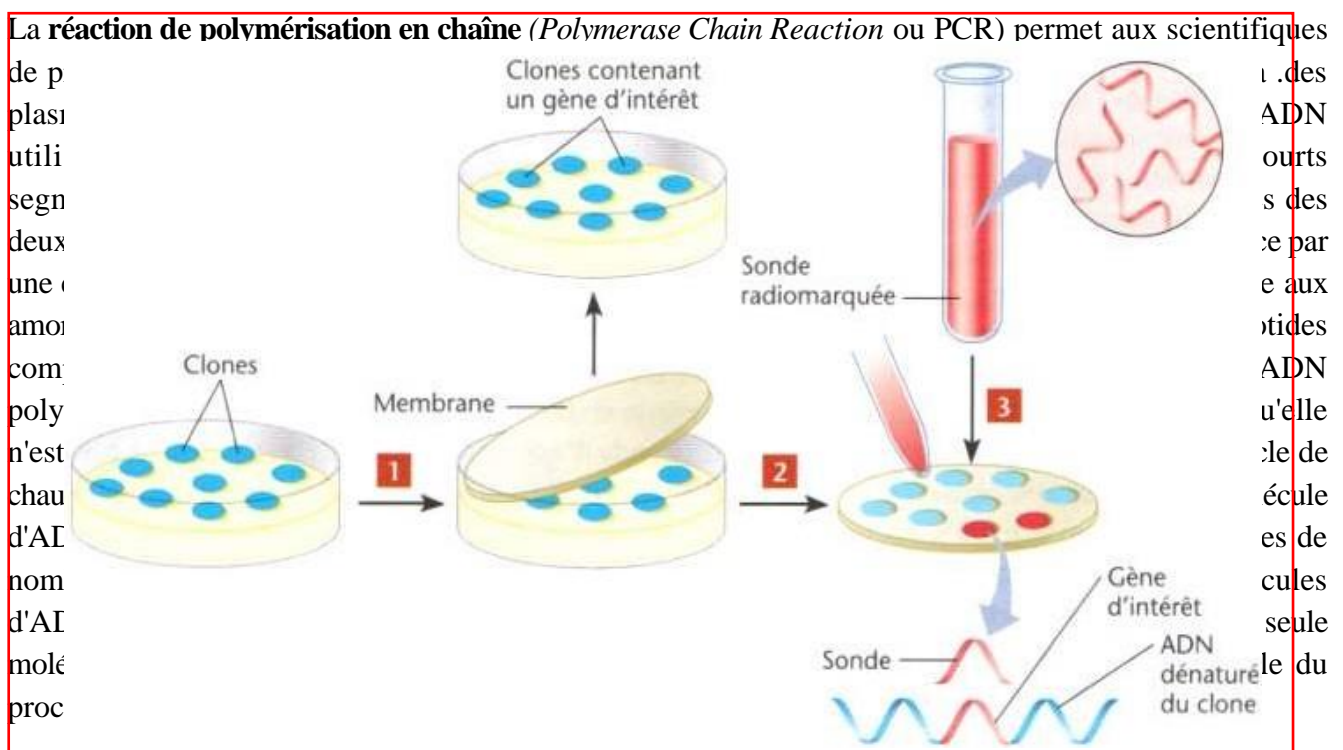
1.. 3-5- Le clonage permet d'obtenir de multiples copies d'un ADN recombinant

L'élaboration d'un organisme transgénique nécessite un grand nombre de copies du gène destiné à être transféré. Ainsi, une fois qu'un fragment d'ADN contenant le gène d'intérêt a été incorporé dans un vecteur, de multiples copies de cet ADN recombinant sont produites par le biais d'une procédure que l'on appelle le clonage de gènes. Lorsque des plasmides sont utilisés comme vecteurs, ils sont généralement réintroduits dans les bactéries qui les reproduisent alors un grand nombre de fois. La division de chaque cellule bactérienne et de leurs cellules filles aboutit à la formation d'un clone constitué de cellules génétiquement identiques. Si la cellule d'origine contient un plasmide recombinant, toutes les cellules du clone posséderont des copies du plasmide muni de son gène étranger. En conditions optimales de culture, une bactérie se multiplie très rapidement : une cellule isolée peut générer un clone de plus de 10 millions de cellules en l'espace de 12 heures.

Cependant, tous les clones ne contiennent pas nécessairement un plasmide pourvu du gène spécifique que l'expérimentateur souhaite transférer dans une plante. Ceci résulte du fait qu'un grand nombre de combinaisons de fragments peuvent se former, suite à l'action de l'ADN ligase. Par exemple, un plasmide peut se refermer sur lui-même sans avoir incorporé d'ADN

étranger, de même que plusieurs fragments d'ADN étranger peuvent se lier sans contenir de plasmide. Les plasmides ayant incorporé de l'ADN étranger peuvent contenir n'importe lesquels des 25 000 à 50 000 gènes que l'on estime présents chez un eucaryote. Comment donc les chercheurs peuvent-ils identifier les clones contenant le plasmide recombinant d'intérêt ? Pour éliminer les bactéries n'ayant reçu aucun plasmide, les chercheurs utilisent au départ un plasmide modifié de telle sorte qu'il contient un gène conférant une résistance à un antibiotique. Les bactéries dépourvues de plasmide seront tuées si cet antibiotique est ajouté au milieu de culture. À l'inverse, celles qui auront incorporé un plasmide survivront et formeront un clone.

3.3. La réaction de polymérisation en chaîne produit de multiples copies d'ADN sans recourir à des cellules



Développée en 1985, la PCR est devenue un outil indispensable dans de nombreux domaines des biotechnologies du fait de son aptitude à recopier des fragments d'ADN de manière rapide et précise. Elle représente aussi une méthode de choix pour cloner des fragments d'ADN disponibles en très faibles quantités. Par exemple, elle pourrait être employée pour cloner l'ADN d'une plante mutante rarissime. Les enquêteurs en médecine légale utilisent la PCR pour amplifier de minuscules traces d'ADN éventuellement trouvées sur des scènes de crime

FIGURE 3.4 : Identification d'un gène cloné

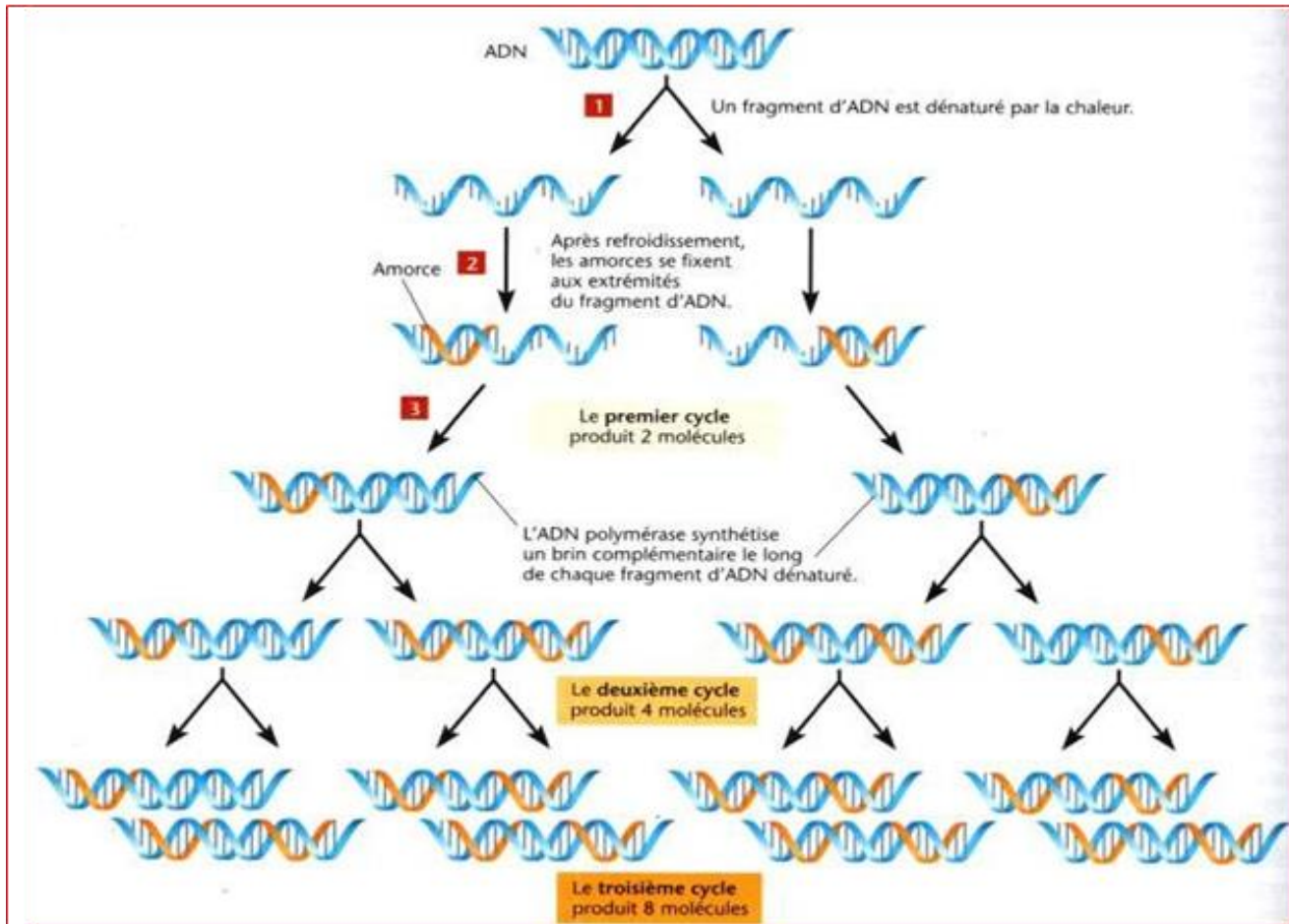
Pour déterminer quels clones parmi des milliers contiennent un gène spécifique, les clones sont exposés à une sonde radiomarquée, constituée d'ARN ou d'ADN simple-brin, complémentaire d'une partie du gène.

Les cellules de chaque clone sont transférées sur une membrane.

L'ADN des cellules est dénaturé (séparé en ADN simple-brin) par la chaleur ou un traitement chimique.

La sonde radiomarquée est appliquée à la membrane. Elle se fixera à toute molécule d'ADN contenant une séquence nucléotidique complémentaire. Toute sonde non fixée est éliminée par

lavages. Les spots radiomarqués restant sur la membrane indiquent la localisation des clones qui contiennent le gène d'intérêt.



**FIGURE 3.5 : La réaction de polymérisation en chaîne
(PCR, Polymerase Chain Reaction)**

1.. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour insérer des gènes dans les cellules végétales

Une fois qu'un gène est cloné, l'étape suivante dans la production d'une plante transgénique consiste à l'insérer dans les cellules de la plante. Lorsque le plasmide Ti est utilisé comme vecteur, cette étape peut être conduite de deux manières. La première consiste à réintroduire le plasmide Ti recombinant dans *A. tumefaciens*, la bactérie qui porte naturellement le plasmide Ti, et d'inoculer les bactéries aux cellules végétales. L'autre manière consiste à introduire directement le plasmide recombinant dans ces cellules. Dans les deux cas, une portion du plasmide contenant le gène d'intérêt s'intégrera aux chromosomes des cellules (figure 3.2, étape 3). Le plasmide Ti fonctionne bien avec des plantes naturellement sensibles à

A. tumefaciens, comme les dicotylédones, ce qui n'est pas le cas des monocotylédones. Bien que

des souches modifiées de la bactérie aient été conçues récemment pour faciliter l'infection des monocotylédones, d'autres méthodes peuvent être également employées pour introduire des gènes étrangers dans le génome des plantes.

a) **Le canon à particules**

Des plantes transgéniques sont parfois obtenues en « tirant » sur des cellules végétales à l'aide d'un **canon à particules** [voir figure 3.6(a)]. Les cibles sont souvent des cellules en culture (voir ci-dessous), ou des protoplastes, autrement dit des cellules dont les parois ont été éliminées par l'action de diverses enzymes. Des cellules de méristèmes apicaux de plantes en croissance peuvent également servir de cibles. Le canon est pointé sur les cellules, puis mis à feu, ce qui entraîne le mouvement d'un macroprojectile, porteur de particules enrobées d'ADN, qui est immédiatement arrêté par un butoir perforé. Les particules enrobées d'ADN sont alors éjectées du macroprojectile, propulsées à travers la perforation du butoir et pénètrent dans les cellules. Si un nombre suffisant de copies du gène d'intérêt est introduit dans les cellules, une ou plusieurs d'entre elles s'intégreront aux chromosomes par crossing-over. L'utilisation du canon à particules est une approche « forcée » qui repose sur une technologie relativement peu sophistiquée n'étant pas toujours couronnée de succès.

b) **L'électroporation**

Dans la technique **d'électroporation**, une brève impulsion de courant électrique est appliquée à une solution contenant des cellules ainsi que des copies d'ADN du gène d'intérêt. Le courant électrique crée de minuscules pores dans la membrane plasmique permettant à l'ADN de pénétrer dans les cellules. Si l'une des copies d'ADN entre dans le noyau, elle pourra être intégrée à un chromosome par recombinaison. L'électroporation est une autre approche « forcée » efficace en raison du très grand nombre de cellules traitées simultanément. Si un gène conférant une résistance à un herbicide et un gène d'intérêt fusionnent, l'emploi d'un herbicide permettra d'éliminer la plupart des cellules qui n'auront pas incorporé le gène.

c) **La microinjection**

Des gènes peuvent être injectés directement dans des protoplastes, et même dans des noyaux, grâce à une très fine aiguille que l'on manipule dans le champ d'un microscope [voir figure 14.6(b)]. Une micropipette exerçant une succion est généralement employée pour maintenir le protoplaste afin qu'il ne soit pas repoussé par l'aiguille.

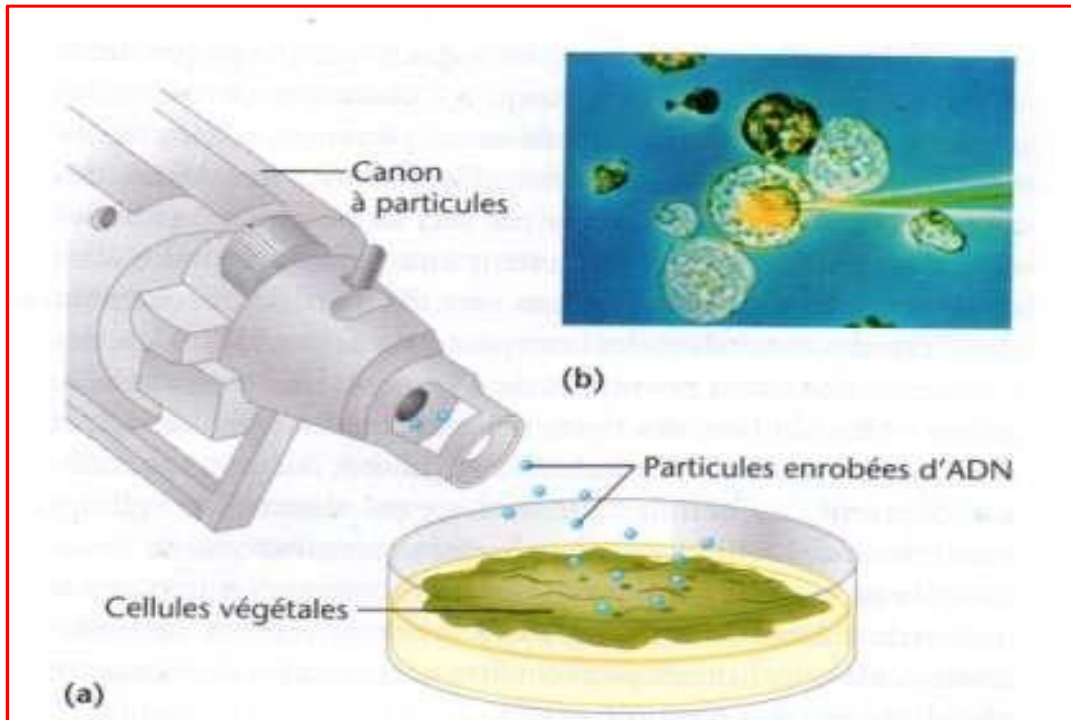


FIGURE 3.6 : Deux méthodes alternatives pour introduire des gènes étrangers dans des cellules végétales.

(a) Un canon à particules projette des microbilles enrobées d'ADN sur des cellules végétales.

(b) Une aiguille fine (à droite) injecte des gènes directement dans le cytoplasme d'un protoplaste pendant que celui-ci est maintenu par succion à l'aide d'une micropipette (absente ici). Que ce soit avec une méthode ou avec l'autre, les gènes qui entrent dans le cytoplasme sont susceptibles d'atteindre le noyau, et de s'incorporer aux chromosomes.

d) Les liposomes

Les liposomes sont des petites sphères lipidiques qui peuvent facilement fusionner avec la membrane plasmique. Une fois remplis de multiples copies du gène d'intérêt, ils sont placés en contact étroit avec des protoplastes. La fusion des liposomes et des protoplastes peut être facilitée en ajoutant du polyéthylène glycol ou d'autres agents chimiques. La libération des gènes dans le cytosol ne garantit pas qu'ils pénètrent dans le noyau, ni qu'ils s'intègrent aux chromosomes.

3.1. La culture *in vitro* permet d'obtenir des plantes à partir de tissus ou de cellules isolées

L'étape ultime de la production d'une **plante transgénique** repose sur la régénération d'une plante entière à partir d'une cellule ayant incorporé un gène étranger dans l'un de ses chromosomes. Les plantes sont des organismes pluricellulaires composés d'un grand nombre de types cellulaires distincts.

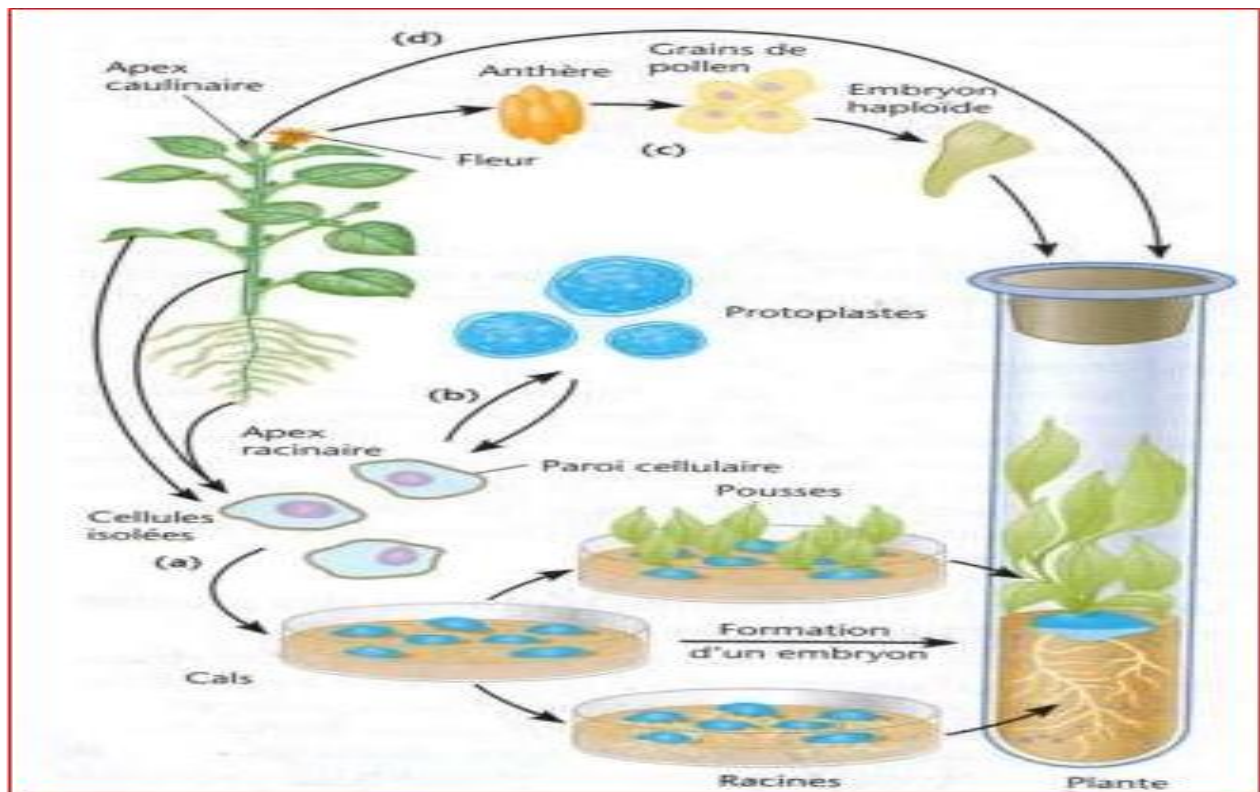


FIGURE 3.7 : La culture des tissus végétaux

Dans la **culture de méristèmes** ou culture d'apex, les extrémités de tiges sont prélevées sur quelques millimètres et sont cultivées sur un milieu qui permet aux bourgeons axillaires, situés à la base de chaque feuille ou de chaque primordium foliaire, de former une plante entière. Étant donné que les cellules situées autour du méristème se divisent fréquemment, elles sont en général exemptes de virus susceptibles d'infecter le reste de la plante. La culture de méristèmes représente donc un moyen efficace pour produire un grand nombre de plantes saines, que ce soit des plantes d'intérieur ou des plantes cultivées comme le bananier.

II- Réalisations et enjeux des biotechnologies végétales

L'association américaine pour l'avancée de la science a reconnu que le fait de pouvoir transférer des gènes d'un organisme à un autre constitue l'une des quatre révolutions scientifiques majeures du XX^e siècle ; les trois autres sont la compréhension de la structure de l'atome, le fait de pouvoir échapper à la gravitation terrestre et le développement d'ordinateurs sophistiqués.

Le tableau 3.1 retrace quelques-unes des étapes historiques qui ont marqué le développement des biotechnologies végétales. Les organismes génétiquement modifiés, végétaux, animaux et bactériens, ont fait leur apparition dans les années 1980. En 2000, plus de la moitié des cultures mondiales de soja et plus du tiers de celles de maïs provenaient de plantes génétiquement modifiées. Les produits dérivés de ces plantes entrent dans la composition de plusieurs centaines de produits alimentaires, dont des aliments pour animaux, des céréales, de l'huile de cuisine, des sirops et des boissons non alcoolisées.

Tableau 3.1 : Quelques événements importants dans le développement du génie génétique chez les plantes

Année	Événement
1866	Gregor Mendel établit les lois fondamentales de l'hérédité
1882	Walther Fleming découvre les chromosomes
1944	Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty prouvent que l'ADN est le support de l'hérédité
1944	Frédéric Sanger utilise la chromatographie pour déterminer la séquence en acides aminés de l'insuline
1947	Le transfert de gènes via des plasmides est découvert
1947	Barbara McClintock rend compte de l'existence des transposons
1953	James Watson et Francis Crick déterminent la structure de l'ADN
1957	Francis Crick et George Gamov proposent le dogme central de la biologie moléculaire qui explique comment les gènes codent les protéines
1961	Marshall Nirenberg décrypte le premier codon
1964	Charles Yanofsky et ses collègues prouvent que les séquences de nucléotides dans l'ADN correspondent à des séquences d'acides aminés dans les protéines
1965	Les enzymes de restriction sont découvertes
1969	Le premier gène est isolé à partir de bactéries
1972	Paul Berg utilise des enzymes de restriction et de l'ADN ligase pour fabriquer la première molécule d'ADN recombinant
1973	Stanley Cohen, Annie Chang et Herbert Boyer produisent le premier organisme transgénique, une bactérie contenant un gène viral
1976	La première société de génie génétique, Genentech, est fondée en Californie
1977	Frederick Sanger annonce sa méthode de séquençage de l'ADN, dite par terminaison de chaîne
1978	La société Genentech et le City of Hope National Medical Center annoncent la production en laboratoire de l'insuline humaine
1980	L'insuline humaine devient le premier produit utile fabriqué par des bactéries transgéniques
1980	Le premier brevet est délivré pour des bactéries génétiquement modifiées
1983	Le groupe pharmaceutique Eli Lilly obtient une licence pour la fabrication de l'insuline humaine
1985	Kary Mullis élabore la réaction de polymérisation en chaîne
1985	Le premier appareil de séquençage automatisé est inventé
1985	Des plantes transgéniques résistantes aux maladies sont testées en champs pour la première fois
1985	La distribution de la première culture génétiquement modifiée, le tabac, a été approuvée aux États-Unis par l'Agence de protection de l'environnement
1987	Des brevets en génie génétique sont appliqués aux plantes et aux animaux
1987	L'entreprise Advanced Genetic Sciences conduit des essais en champs sur des bactéries génétiquement modifiées pour prévenir la formation de givre sur les fraises
1987	La société Calgene obtient un brevet pour une tomate à conservation prolongée, laquelle produit un ARN antisens inactivant le gène de la polygalacturonase
1990	La transformation du maïs à l'aide du canon à particules est annoncée
1994	La société Calgene obtient l'approbation de l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) pour la tomate Flavr Savr®
2000	Le génome d' <i>Arabidopsis thaliana</i> est complètement séquencé
2002	Le génome du riz (<i>Oryza sativa</i>) est complètement séquencé

3.2.1. La génomique et la protéomique fourniront des informations utiles pour les futures applications du génie génétique

Les scientifiques déterminent la séquence nucléotidique d'un génome en découpant les chromosomes en fragments à l'aide d'enzymes de restriction. Chaque fragment est cloné puis séquencé, et les séquences chevauchantes de ces fragments sont ordonnées pour établir la séquence de chaque chromosome. La séquence en acides aminés d'une protéine est déterminée selon une procédure fondamentalement similaire. La protéine est scindée en fragments sous l'action de protéases, des enzymes qui rompent la chaîne polypeptidique entre des acides aminés spécifiques. Chacun des fragments est microséquencé et les

séquences chevauchantes des différents fragments révèlent la séquence complète de la protéine. La robotisation et les ordinateurs simplifient le séquençage de l'ADN et des protéines.

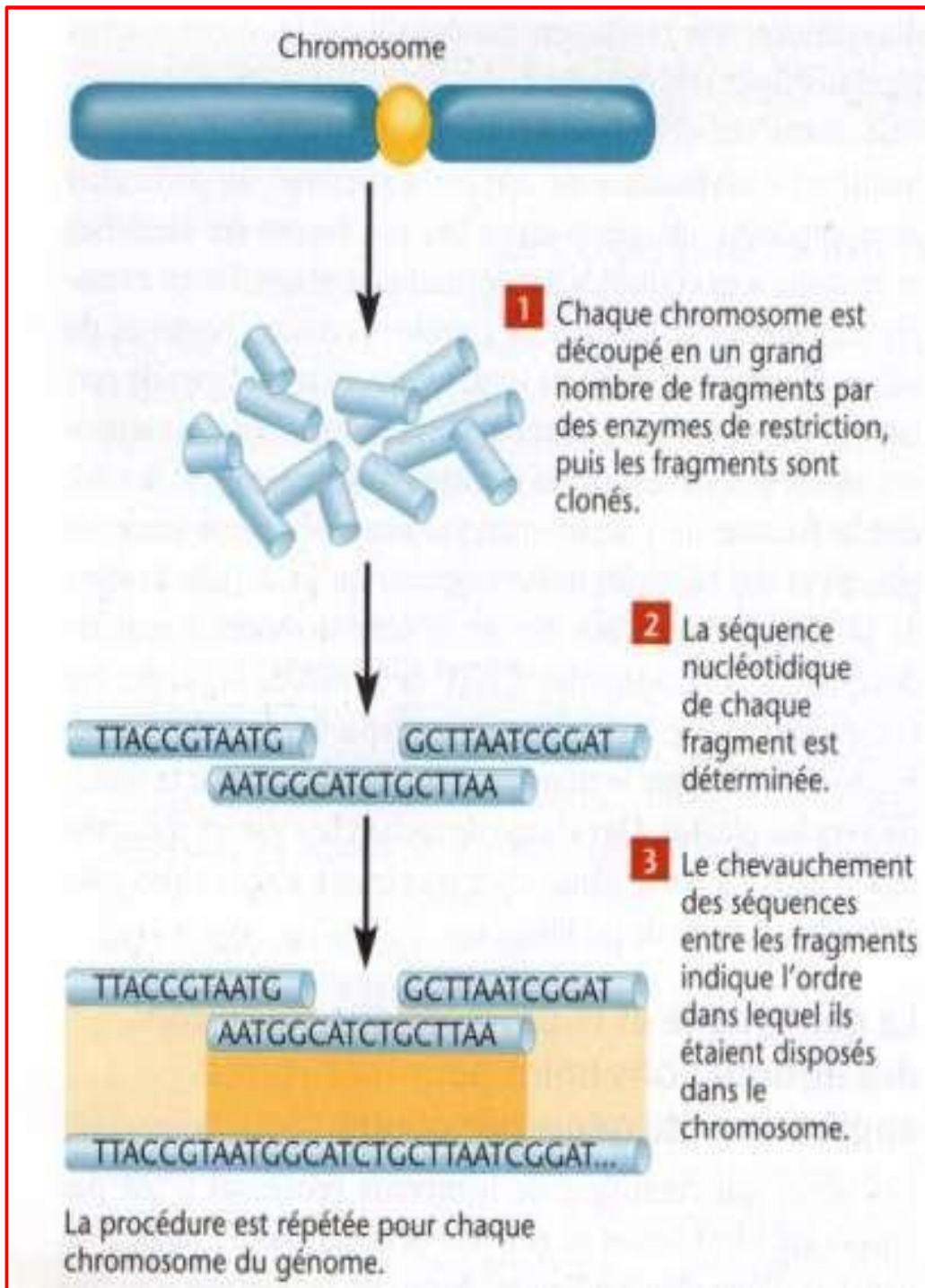


FIGURE 3.12 : Le séquençage d'un génome.

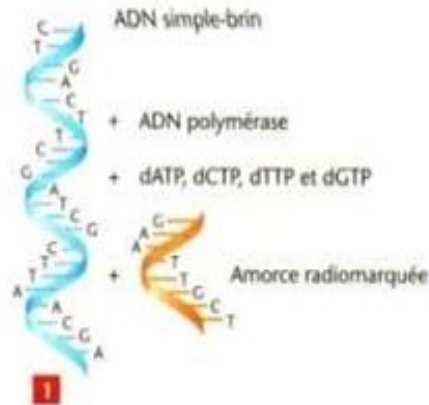
3.2.2. Le séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger

Notre aptitude à déterminer rapidement la séquence nucléotidique des gènes et des génomes a joué un rôle central dans les progrès des biotechnologies végétales et du génie génétique. Le séquençage de l'ADN est généralement automatisé et repose sur l'usage de machines sophistiquées, d'ordinateurs, ainsi que sur une méthode mise au point dans les années 1970 par le scientifique britannique Frederick Sanger, pour laquelle il a reçu le prix Nobel en 1980.

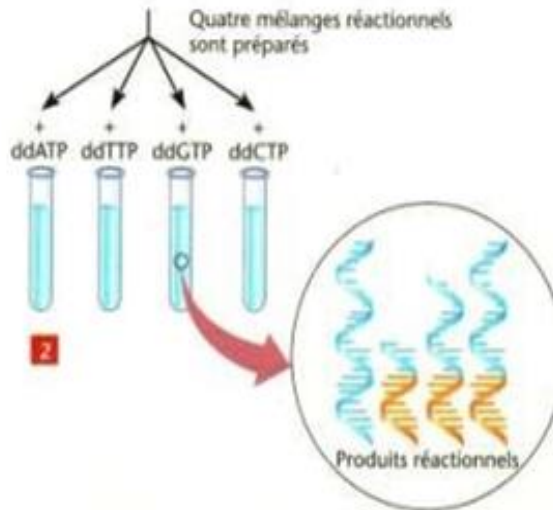
Lorsque l'ADN est répliqué, une ADN polymérase synthétise deux nouveaux brins en utilisant les deux brins parentaux comme matrice (voir chapitre 13). Dans la méthode de Sanger, les nouveaux brins se forment à partir des quatre nucléotides normaux (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et de quatre nucléotides modifiés (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP). L'ADN polymérase incorpore indifféremment les nucléotides normaux et les nucléotides modifiés à la chaîne d'ADN en cours de synthèse. Cependant, aussitôt qu'elle utilise un nucléotide modifié, la synthèse de la chaîne est arrêtée.

La clé de la méthode de Sanger consiste à utiliser un nombre suffisant de chacun des huit nucléotides pour s'assurer que la synthèse de certaines chaînes s'arrête alors que celle des autres se poursuit. Dans ces conditions, des chaînes d'ADN de différentes longueurs sont produites. Ces chaînes sont ensuite séparées par une électrophorèse qui les ordonne en fonction de leur longueur. La séquence de nucléotides de toute la molécule d'ADN peut ainsi être déduite d'après la longueur des chaînes nouvellement synthétisées.

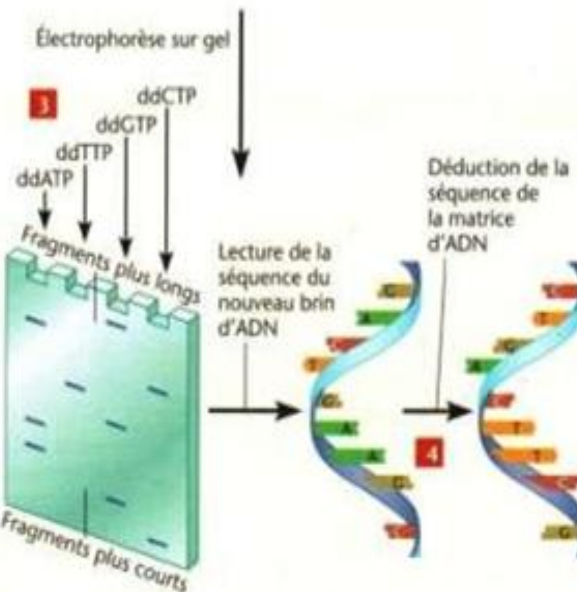
Une variante non radioactive de la méthode de Sanger consiste à relier chaque classe de nucléotides modifiés à une molécule fluorescente spécifique. Après migration sur un gel d'électrophorèse, la couleur de chaque chaîne d'ADN indique le dernier nucléotide à avoir été ajouté.



1 Un échantillon contenant plusieurs copies du segment d'ADN simple-brin à séquencer est divisé en quatre lots. Chaque lot est incubé en présence de l'amorce radiomarquée, des quatre désoxynucléotides triphosphates, de l'ADN polymérase et de l'un des didéoxynucléotides triphosphates (ddATP, ddTTP, ddCTP ou ddGTP).



2 L'amorce initie la synthèse de la nouvelle molécule d'ADN qui progresse jusqu'à l'incorporation d'un didéoxynucléotide triphosphate. Des produits réactionnels de tailles variables sont alors générés.



3 Les produits réactionnels sont séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Les bandes sont identifiées grâce à leur marquage radioactif. Les brins d'ADN de grandes tailles migrent moins rapidement que ceux de petites tailles.

4 La séquence nucléotidique de l'ADN simple-brin est déterminée d'après l'ordre de migration des fragments et la nature du nucléotide terminal.

■ La méthode de Sanger

2... **3.2.3. L'analyse de l'ADN en criminologie**

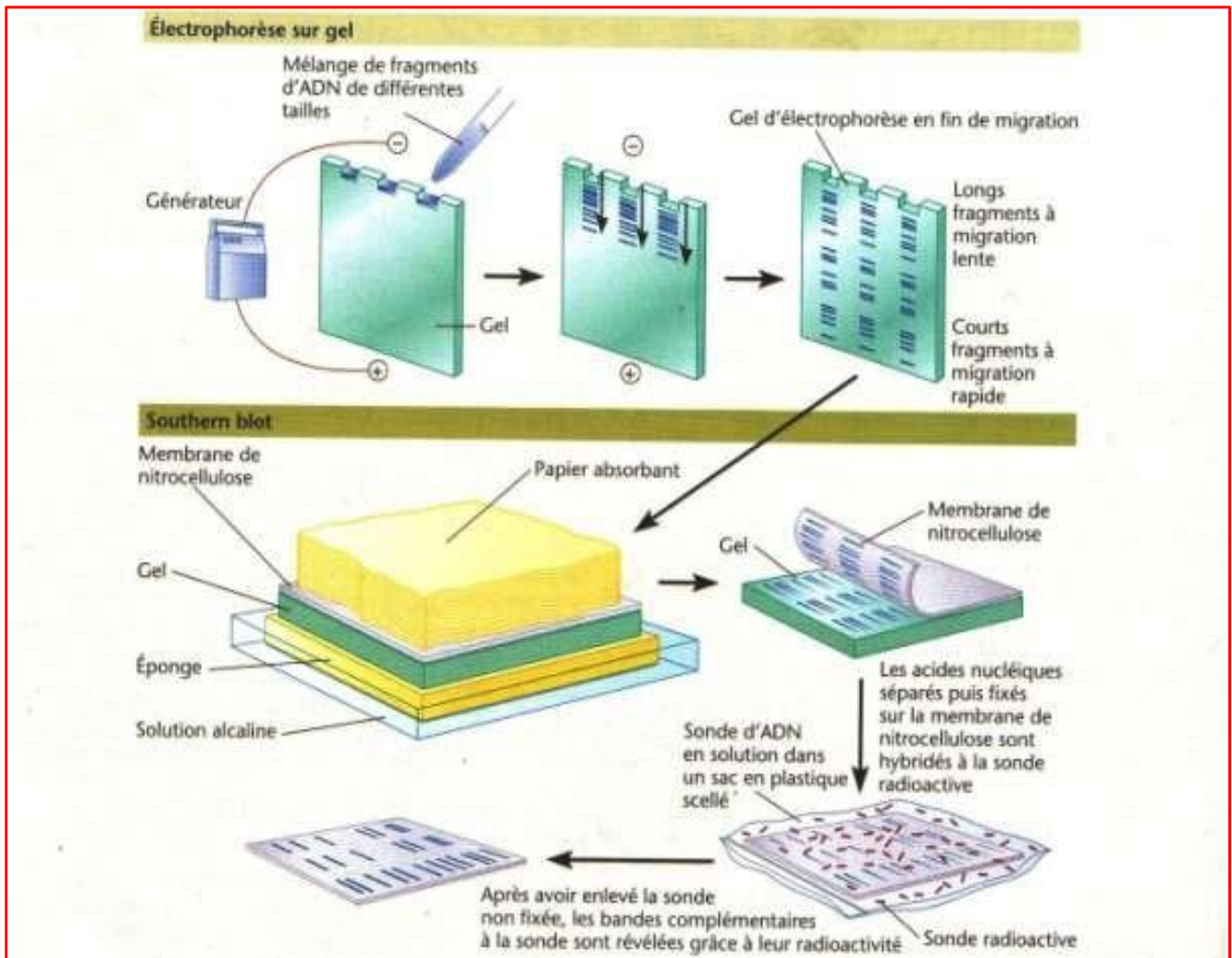


FIGURE 3.13 : Méthodes de Southern Blot

Résumé du troisième chapitre

1) Méthodes des biotechnologies végétales :

- **Les gènes peuvent être transférés d'une espèce à l'autre grâce au génie génétique** : Le génie génétique utilise des techniques moléculaires pour transférer des gènes d'un organisme à un autre, générant ainsi des organismes transgéniques. L'introduction de nouveaux caractères chez les plantes est beaucoup plus rapide par le biais du génie génétique que par les méthodes traditionnelles de sélection.
- **Les plasmides servent souvent de vecteurs au transfert de gènes chez les plantes** : Chez les plantes, le génie génétique fait souvent appel à l'utilisation de plasmides qui sont des molécules circulaires d'ADN présentes dans les bactéries. Certains plasmides, comme le plasmide Ti, peuvent transporter un segment d'ADN d'un autre organisme à l'intérieur de la cellule végétale et intégrer cet ADN dans les chromosomes de la plante.
- **Les enzymes de restriction et l'ADN ligase sont utilisés pour fabriquer de l'ADN recombinant** : Les enzymes de restriction coupent l'ADN en fragments au niveau de séquences spécifiques réparties dans l'ADN. Les fragments formés par la plupart des enzymes de restriction ont des extrémités cohésives, simple-brin, pouvant se lier à des séquences complémentaires appartenant à d'autres fragments. Des fragments d'ADN d'origine différente peuvent s'assembler les uns aux autres au niveau de leurs extrémités cohésives et être liés de manière définitive grâce à l'ADN ligase pour former un ADN recombinant.
- **Le clonage permet d'obtenir de multiples copies d'un ADN recombinant** : Si des plasmides contenant un ADN recombinant sont réintroduits dans des bactéries, ils seront copiés en même temps que la bactérie se multipliera pour former un clone. De nombreuses copies d'un ADN recombinant peuvent être reproduites en quelques heures. Des sondes d'acide nucléique sont utilisées pour déterminer quels clones contiennent un gène spécifique d'intérêt.
- **La réaction de polymérisation en chaîne produit de multiples copies d'ADN sans recourir à des cellules** : La réaction de polymérisation en chaîne est un procédé automatique permettant de reproduire rapidement de multiples copies d'un fragment d'ADN spécifique. La réaction se fait dans un tube, en présence d'ADN polymérase, et nécessite des cycles répétés de réchauffement et de refroidissement.
- **Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour insérer des gènes dans les cellules végétales** : Les spécialistes du génie génétique utilisent le plasmide Ti, le canon à particules, l'électroporation, la microinjection ou les liposomes pour introduire, dans les cellules végétales, un gène cloné.

- **La culture *in vitro* permet d'obtenir des plantes à partir de tissus ou de cellules isolées** : Les cellules végétales qui contiennent des gènes étrangers peuvent être induites à régénérer une plante entière si elles sont placées dans un milieu artificiel contenant des éléments nutritifs et des hormones. La plante obtenue possédera le gène étranger dans l'ensemble de ses cellules.

2) Réalisations et enjeux des biotechnologies végétales

- **Le génie génétique a rendu les plantes plus résistantes aux pesticides, à l'aridité des sols et leur a conféré une plus grande productivité** : Des plantes ont été modifiées pour résister aux insectes, aux champignons, aux virus, à la sécheresse, à la salinité et à l'acidité des sols, aux métaux lourds et aux herbicides. D'autres plantes transgéniques produisent également plus de graines et de fruits.
- **Les plantes transgéniques contribuent à la santé et à l'alimentation humaine** : Des plantes transgéniques produisent des médicaments, les polypeptides de l'hémoglobine humaine et des vaccins oraux. Le riz a été génétiquement modifié pour contenir davantage de vitamine A et de fer.
- **Les cultures génétiquement modifiées nécessitent de nombreux essais en champs et des études de marché avant leur commercialisation** : Plusieurs années d'essais sont nécessaires pour déterminer si une culture transgénique est génétiquement stable et si elle peut être mise sur le marché.
- **Les cultures génétiquement modifiées doivent être sans danger pour l'environnement et les consommateurs** : De nombreuses personnes se préoccupent de savoir si les plantes transgéniques peuvent transférer des gènes étrangers à d'autres organismes ou peuvent avoir des effets nuisibles chez les personnes qui les consomment. Des tests minutieux sur les plantes transgéniques doivent être effectués pour répondre à ces questions.
- **L'avenir promet de nombreuses applications des biotechnologies végétales** : Les projets à venir en matière de génie génétique concernent le transfert de gènes du métabolisme C4 et de gènes de la fixation de l'azote à des plantes. Beaucoup de ces projets ont pour objectif global d'augmenter la productivité des plantes cultivées.
 - **La génomique et la protéomique fourniront des informations utiles pour les futures applications du génie génétique** : La génomique, qui a pour but de déterminer la séquence nucléotidique de l'ensemble des génomes, ainsi que la protéomique, qui a pour but de séquencer toutes les protéines d'un organisme, aideront à identifier des gènes pour produire des plantes transgéniques utiles.