

Génome chloroplastique

I. Introduction

Une plante verte contient trois types d'organites, le noyau, les mitochondries et les plastes qui répliquent, transcrivent et expriment leur information génétique de manière coordonnée.

L'existence d'une hérédité extranucléaire liée à un organite a été postulée par les études génétiques du feuillage panaché de certaines plantes (**Baur et Correns, 1909**), en liaison avec la topologie des chloroplastes verts que renferment leurs feuilles. L'analyse génétique de la distribution de caractères plastidiaux dans la descendance de plantes supérieures a montré ensuite leur répartition non mendélienne, ce qui ouvrit la voie aux notions d'hérédité maternelle et d'hérédité cytoplasmique.

Les chloroplastes sont des organites cellulaires présents dans le cytoplasme des végétaux qui sont exposés à la lumière. Ils sont le siège de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ils participent également à la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides, des lipides et de l'amidon (Prescott *et al.*, 2005). Dans les années 70, il a été démontré que ces organites possèdent leur propre génome, ce qui a mené à des études intensives sur la structure et l'expression de l'ADN chloroplastique (**ADNcp**).

Les chloroplastes possèdent des structures membranaires lamellaires, les thylakoïdes, qui portent des molécules de pigment vert: la chlorophylle. Ces chloroplastes évoluent également selon la présence ou l'absence de **lumière** dans leur environnement.

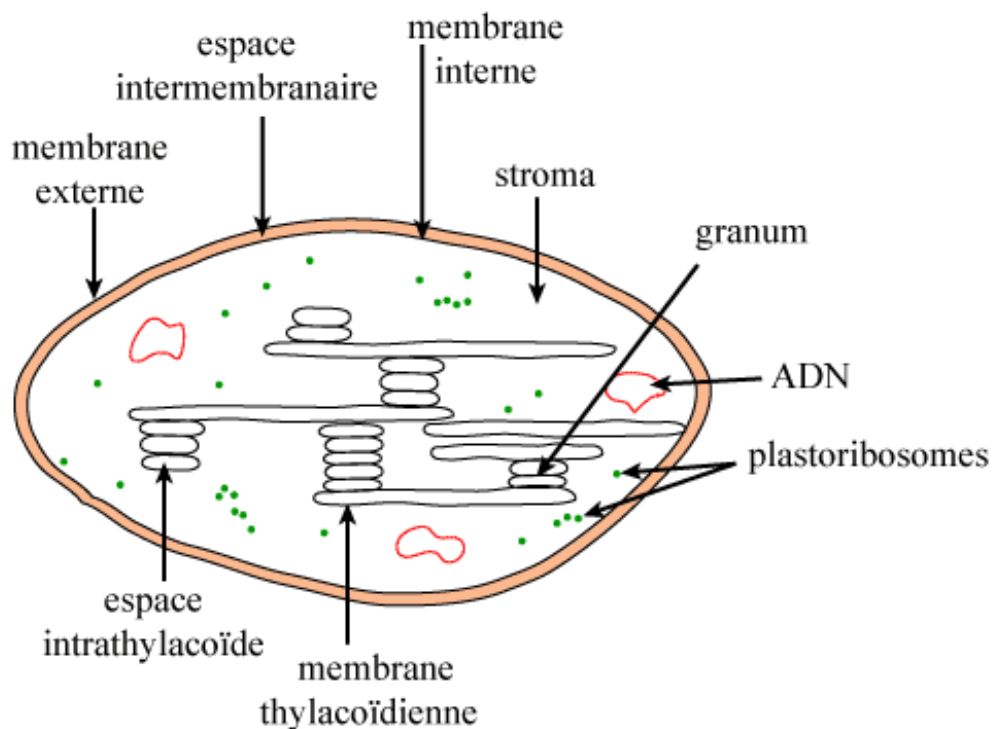


Figure 1. Structure du chloroplaste montrant l'organisation de l'ADN chloroplastique

Une plante qui pousse à l'obscurité à des feuilles de couleur jaune et ses chloroplastes ne contiennent pas de chlorophylle. En présence de lumière, les chloroplastes évoluent: la synthèse de la chlorophylle démarre, les membranes prennent leur forme lamellaire et les thylakoïdes apparaissent. Cette transformation est réversible en l'absence de lumière.

II. Organisation

Dans les chloroplastes s'effectue la fixation du carbone atmosphérique, base de la vie sur terre (photosynthèse). Il y a **plusieurs chloroplastes** dans **une cellule** végétale eucaryote. Chacun de ces organites (chloroplastes) possède plusieurs copies d'un génome circulaire mesurant de 120 à 217 kpb (150 kpb en moyenne) chez les plantes supérieures. Ce génome s'apparente à celui des cyanobactéries. Le séquençage complet de l'ADN chloroplastique a été réalisé chez plusieurs plantes très éloignées au sens botanique (algues, bryophytes, gymnospermes, angiospermes). Chez les plantes terrestres, l'organisation de ce génome circulaire est remarquablement conservée. Le génome chloroplastique se caractérise chez la plupart des espèces, à l'exception de certaines légumineuses et des conifères, par la duplication d'une région contenant l'ADN ribosomique chloroplastique. Les deux répétitions sont inversées et séparent une grande et une petite région d'ADN en copie unique. Par recombinaison au niveau de ces séquences, deux isomères de la molécule d'ADN sont obtenus qui diffèrent par l'orientation de ces deux régions non répétées.

Génome chloroplastique de l'hépatique, *Marchantia polymorpha*



Le 1^{er} à avoir été séquencé :
-136 gènes,
-31 types d'ARN-t,
-90 gènes protéiques dont
-20 pour la photosynthèse
et le transport d'électrons

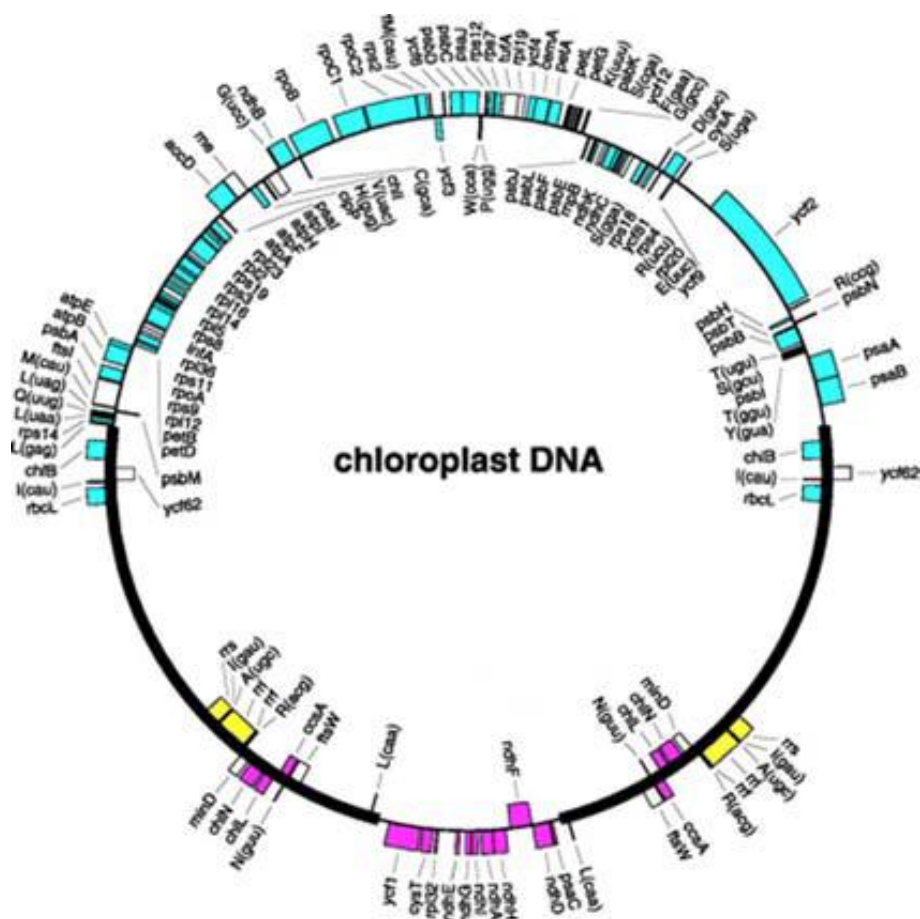
Figure 2. Génome chloroplastique de l'hépatique : *Marchantia polymorpha*

III. Caractéristiques du Génome chloroplastique

Les gènes de l'ADN chloroplastique se répartissent en deux catégories, ceux impliqués dans l'expression des gènes et ceux ayant une fonction bioénergétique. La première catégorie inclut tous les ARN nécessaires à l'expression des gènes (30 ARN de transfert et 4 ARN ribosomiques), 21 protéines ribosomiques et 4 sous-unités de l'ARN polymérase. La seconde catégorie comprend 29 gènes impliqués dans la photosynthèse et 11 dans la photorespiration. Parmi eux se trouve le gène **rbcL** qui code pour la grande sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase. Cette enzyme clé de la photosynthèse, qui fixe le CO₂, est de loin la protéine la plus abondante sur la terre, représentant près de 50 % des protéines foliaires. Elle est constituée de sous-unités codées par le génome chloroplastique et par le génome nucléaire, illustrant l'étroite collaboration entre les deux génomes. Une douzaine d'autres gènes codent pour des protéines de fonction encore inconnue.

Bien que des séquences d'ADN chloroplastique se retrouvent fréquemment dans le génome nucléaire ou mitochondrial, le contraire n'est pas vrai, cela étant peut-être lié au compactage assez poussé du génome chloroplastique. Quelques gènes possèdent néanmoins des introns, et le phénomène d'« édition » des messagers, moins fréquent que dans les mitochondries, a également été décrit dans les plastes.

En effet, **s'il est généralement hérité maternellement**, il existe d'importantes exceptions : d'une part de nombreuses espèces d'angiospermes transmettent de façon épisodique leurs chloroplastes par voie paternelle, d'autre part des groupes entiers comme les conifères transmettent leur ADN chloroplastique par voie exclusivement paternelle.



Exemple de plante : le blé

Le génome chloroplastique du blé est de 135kpb. Ce génome comporte environ 125 gènes (des gènes permettant la synthèse de protéines, des gènes permettant la synthèse d'ARN non traduits - par exemple les ARN impliqués dans la formation des ribosomes).

L'ADN chloroplastique (ADNcp) - du fait qu'il est présent en plusieurs copies dans l'organite (il est polyploïde) et qu'il existe en général plus d'un chloroplaste par cellule - représente **de 5 à plus de 20% de l'ADN total** (Rauwolf *et al.*, 2010).

IV. Morphologie

Assez uniformes chez les végétaux supérieurs, les chloroplastes sont morphologiquement très divers chez les Algues. Les chloroplastes des végétaux supérieurs ont le plus souvent une forme lenticulaire et leur plus grand diamètre est de l'ordre de 3 à 6µm. Leur épaisseur est voisine de 2µm. Les cellules chlorophylliennes en renferment un nombre indéterminé, parfois très élevé (cellules palissadiques des feuilles).

Dans les chloroplastes des végétaux supérieurs, la chlorophylle n'est pas uniformément disséminée. On peut voir, sur le vivant, des granules plus vivement colorés en vert dans le stroma des chloroplastes. Ces granules sont appelés « grana ».

V. Les chloroplastes et la transgénèse

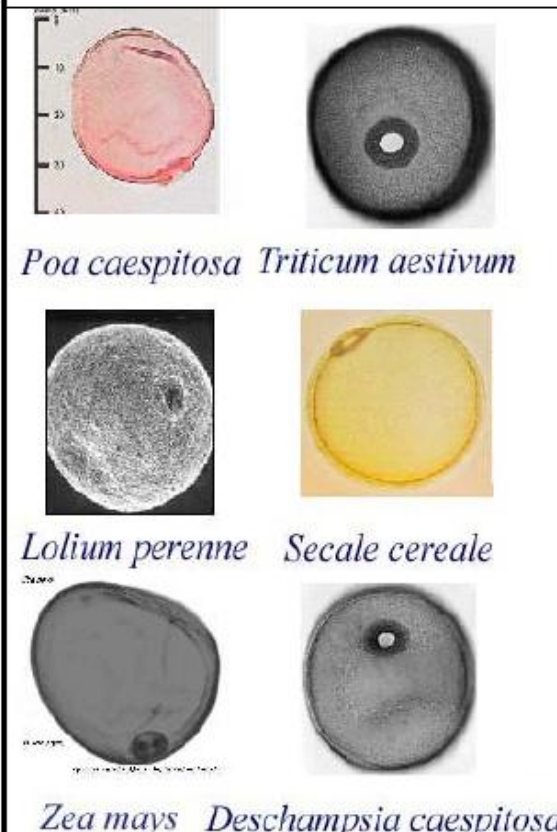
Les **chloroplastes** sont **absents des grains de pollen** (gamète mâle). Ils se transmettent par voie maternelle, par le cytoplasme des ovules. Cette caractéristique a suggéré la possibilité de créer des plantes transgéniques en insérant le gène d'intérêt dans le génome du plaste.

Si on crée une plante transgénique en insérant un gène dans le génome de ses chloroplastes, il n'y aura pas de transfert du gène par le pollen et pas de contamination possible à d'autres plantes de même espèce.

Le génome du chloroplaste est court (120 gènes), il est contenu dans une molécule d'ADN de forme circulaire. 50 à 100 copies de cette molécule sont présentes dans chaque chloroplaste, ce qui augmente les chances d'intégrer le fragment d'ADN d'intérêt lors de la transgénèse.

Ainsi, certaines transgénèses ont été réalisées chez les végétaux verts, par l'intermédiaire de leurs chloroplastes: en 1998 le gène de résistance au Glyphosate (un herbicide) a été introduit dans des chloroplastes de pieds de tabac, et en 1999 une résistance aux chenilles de Pyrale (insectes parasites) a été transmise au maïs en introduisant le gène de la toxine Bt (du bacille thuringensis) dans l'ADN des chloroplastes. Cette toxine est produite dans les feuilles, ce qui provoque une forte mortalité des insectes qui les ingèrent, mais elle n'est pas présente dans les fruits, consommés par les animaux.

La transformation du chloroplaste




Poa caespitosa *Triticum aestivum*

Lolium perenne *Secale cereale*

Zea mays *Deschampsia caespitosa*

Le **chloroplastes** sont présents dans le tissus verts, mais ils **sont absents dans les pollens**. Les chloroplastes en fait sont hérités par voie maternelle.

Cette caractéristique à suggéré la possibilité de créer de plantes transgéniques en insérant le gène d'intérêt dans le génome du plaste



Pas de transfert du gène par le pollen (comme il se passe avec les gènes du noyau)

En plus, il y a centaines de copie du même gène. En fait, jusqu'à 100 copies de l'ADN par chloroplaste et 100 chloroplastes par cellule permettent d'avoir jusqu'à 10000 copies d'un gène (seulement 2 pour un gène nucléaire)

Figure 3. Transformation du chloroplaste

Cellule eucaryote : cellule présentant plusieurs compartiments, dont un noyau renfermant plusieurs chromosomes et entouré d'une enveloppe.

Transgénèse : technique consistant à faire acquérir un nouveau caractère à une cellule, en lui intégrant le gène correspondant (gène qui lui est étranger ou transgène) dans son génome.

Fragment d'ADN d'intérêt : c'est le fragment d'ADN qui contient le gène présentant un intérêt et que l'on cherche à faire exprimer par la plante.

V.I. Technique de transformation du chloroplaste

Après bombardement des feuilles avec l'ADN contenant le gène d'intérêt et la recombinaison homologue (insertion) avec l'ADN chloroplastique, on obtient une plante transformée.

Canon à particule : Des micro-projectiles d'or enrobés d'ADN sont projetés sur une feuille placée dans l'enceinte sous vide du canon. Les feuilles sont découpées en petits fragments placés sur un milieu de sélection contenant la spectinomycine. Les cellules renfermant des chloroplastes transformés vont se diviser et donner des cals puis des plantules qui pourront être repiquées sur sol lorsqu'elles auront raciné. Après traitement au PEG en présence d'ADN, les protoplastes en suspension dans le milieu liquide se

divisent et forment des micro-cals. Les plantules qui se développent à partir du cal sont des transformants chloroplastiques qui pourront être repiqués sur sol lorsque les racines seront développées

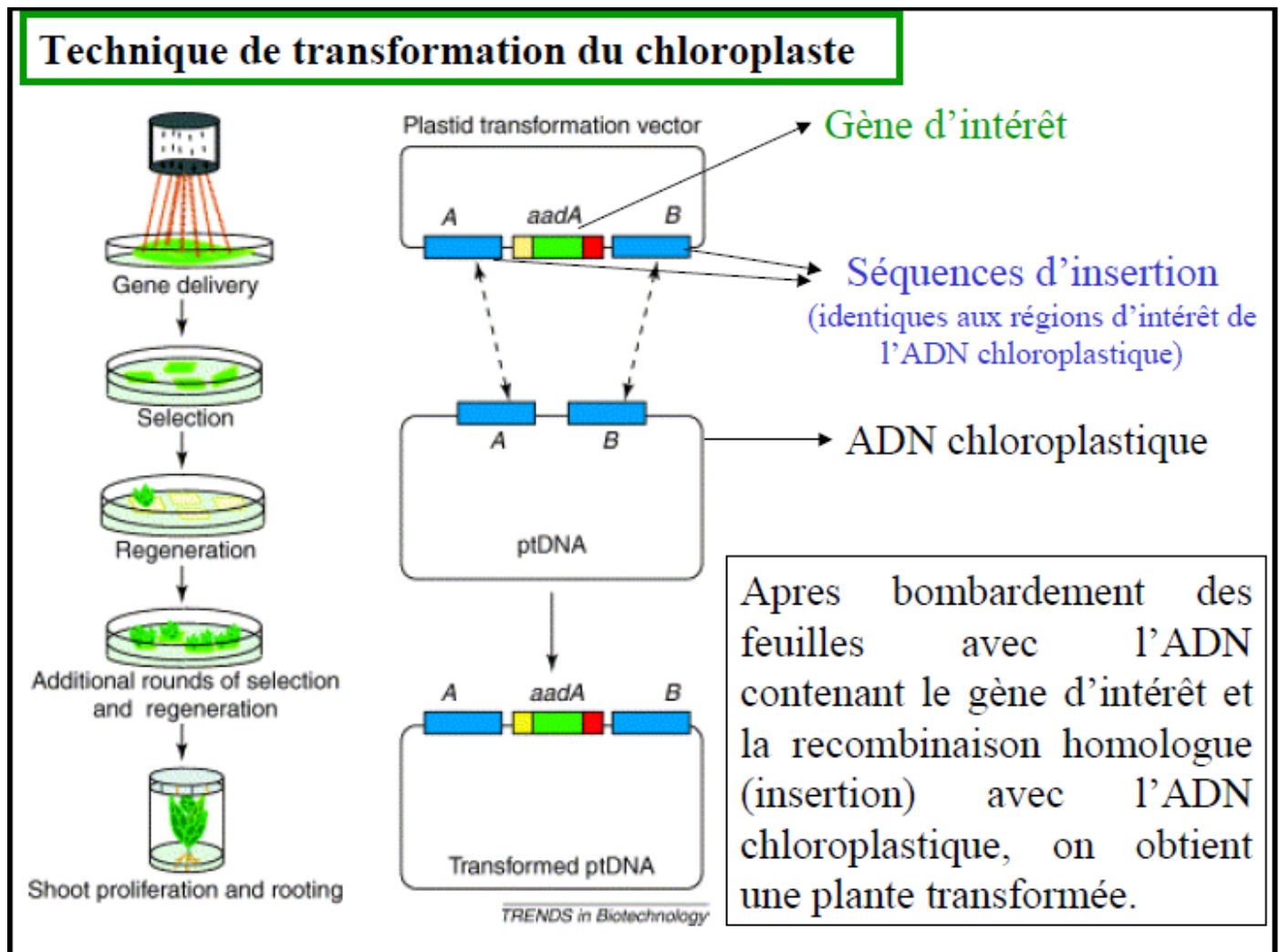


Figure 4. Techniques de transformation du chloroplaste

V.II. Quelques applications de la transformation du chloroplaste

V.II.1. Résistance au glyphosate

Daniell *et al.*, (1998) a transformé avec succès des plants de tabac avec le gène de résistance au glyphosate inséré dans le génome du chloroplaste. Les plantes sont résistantes et le gène ne peut être transféré par le pollen à d'autres végétaux

V.II.2. Résistance aux insectes grâce à la toxine Bt

Les toxines de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont toxiques pour les insectes après ingestion. Kota *et al.*, (1999) ont observé que l'expression de la toxine Bt dans les chloroplastes permet de protéger les plantes des attaques (i.e. pyrale *Ostrinia nubilalis*)

Quelques applications de la transformation du chloroplaste

La résistance au glyphosate

Le Glyphosate est un puissant herbicide avec un bas impact environnemental, utile pour éliminer les plantes infestantes d'une culture résistante.

Daniell et al. (1998) a transformé avec succès des plantes de tabac avec un gène de résistance au glyphosate inséré dans le génome du chloroplaste. Les plantes sont résistantes et le gène ne peut pas être transféré par le pollen à des autre plantes.



Résistance aux insectes grâce à la toxine Bt

Les toxines du *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont toxiques pour les insectes après ingestion (mais elles ne sont pas toxiques pour les animaux). Kota et al. (1999) ont vu que l'expression de la toxine Bt dans les chloroplastes de plante porte à une mortalité élevée des insecte en protégeant les plantes des attaques. En plus l'expression de la toxine est localisée dans les feuilles et absente dans le tissus (fruits, grains) qui sont mangés par les animaux.



VI. Structure

Le génome chloroplastique (ADNcp) se présente sous la forme de molécules circulaires d'ADN (acide désoxyribonucléique) tout comme les génomes bactériens. Une cellule chlorophyllienne possède en moyenne une centaine de chloroplastes et un chloroplaste renferme une centaine de copies de cette molécule circulaire.

Tableau1. Taille de quelques génomes chloroplastiques chez quelques espèces végétales

	Espèce	Taille (kpb)
Pin	<i>Pinus sp</i>	120
Riz	<i>Oriza sativa</i>	134
Arabette	<i>Arbidopsis thaliana</i>	154
Tabac	<i>Nicotiana tabacum</i>	156
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	158
Pelargonium	<i>Pelargonium horteam</i>	217
Clamydomonas	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	292

Chlamydomonas est une algue verte unicellulaire.

Ainsi, une cellule possède environ 10 000 copies d'un gène chloroplastique. Le génome chloroplastique du tabac a été le premier génome séquencé (Shinozaki et al., 1986) et, depuis d'autres séquençages complets ont été réalisés. La taille des molécules circulaires d'ADN cp est comprise en moyenne entre 120 et 160 kpb (**Tableau.1**).

Le génome chloroplastique compte en moyenne 120 à 130 gènes. Environ 70 gènes codent des protéines impliquées dans l'expression de ce génome (ARN polyméras, protéines ribosomales, facteurs de traduction, etc.) ou dans les processus bioénergétiques de la photosynthèse ou de la photorespiration (protéines membranaires des thylacoïdes, grande sous unité de la ribulose biphosphate carboxylase (gène *rbcL*), ATP synthétase, etc), le génome code également des protéines ribosomiques (3 à 5) et des ARN de transfert (environ 30).

L'ADN chloroplastique (ADN cp) est largement utilisé car :

- il est stable dans une espèce,
- petit (~150 kbp = 150 000 paires de bases) et circulaire
- se trouve en très grande quantité dans les cellules végétales : Nombreuses copies (50-100)
- peu de gènes (~120):
- ARN ribosomale (rRNA)
- ARN transfert (tRNA) pour la traduction plastidiale
- gènes pour le ribosome chloroplastique
- 4 gènes codant des sous unités de l'ARN polymérase
- 01 gène pour la sous unité grande de la RUBISCO
- 9 gènes pour les photosystèmes I et II
- 6 gènes pour l'ATP synthase

L'ADN chloroplastique contient plusieurs gènes dont un est le plus utilisé le *rbcL*: gène codant pour la grande (L=large) sous-unité de RUBISCO (une des enzymes les plus importantes de la photosynthèse).

Résumé :

Le génome chloroplastique

- Il est court (120 gènes),
- il est contenu dans une molécule d'ADN de forme circulaire.
- 50 à 100 copies de cette molécule sont présentes dans chaque chloroplaste, ce qui augmente les chances d'intégrer le fragment d'ADN d'intérêt lors de la transgénése.

- Sa taille varie, selon l'espèce considérée,
- de 120 000 à 180 000 paires de bases.
- Il code pour 4 RNA ribosomiques, 30 RNA de transfert et une quarantaine de protéines identifiées.
- L'ADN chloroplastique (ADN cp), du fait qu'il est présent en plusieurs copies dans l'organelle (il est polyploïde) et qu'il existe en général plus d'un chloroplaste par cellule - représente **de 5 à plus de 20% de l'ADN total** (Rauwolf *et al.*, 2010).

N.B : Le génome des mitochondries est moins utilisé, car il est très instable et très différents d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce, il est fréquemment réarrangé.

Le génome nucléaire, on a une seule copie (2 chromosomes).

Les données sont recueillies suivant les progrès de la technologie moléculaire. Au départ, c'est le cas des analyses de restriction (extraction d'ADN, coupure par enzyme de restriction, migration sur gel, code barre puis comparaison) mais maintenant, il s'agit des analyses par séquençage.