

Stabilité de transgènes de chicorée (*Chichorium intybus*)Malika ABID¹, Aatika MIHAMOU¹ & Abdelmajid BELABED^{1a}

(Reçu le 21/02/2000 ; Revisé le 12/01/ 2001 ; Accepté le 28/01/2001)

استقرار مورث الشيكوري

في هذه الدراسة تم تحليل الجيل الأول والثاني لنبات الشيكوري المحول وراثيا، بواسطة البناء البلازميدي pTDE4 الحاوي لكل من المورث (*uidA*) المراقب من طرف المحفز (35 SCAMV) و المورث *npt II* المراقب من طرف المحفز *nos*، بغية تتبع المورثان المنقولان ومدى استقرارهما. وقد أظهرت التحليلات المعتمدة لتقنيات Southern، و PCR وجود حذف في المتتاليات المندمجة في النباتات التي تحتوي على نسخة واحدة أو أكثر من المورثان المنقولان

الكلمات المفتاحية : *Chichorium intybus* - استقرار المورثان - مورث *uid A* - *npt II*

Stabilité de transgènes de chicorée (*Chichorium intybus*)

Les générations F₁ et F₂ des chicorées transformées génétiquement à l'aide de pTDE4 où le gène *uid A* est régulé par le promoteur 35S CaMV et le gène *npt II* est derrière le promoteur *nos* (nopaline synthase) sont analysées afin de déterminer la transmission et la stabilité des transgènes à travers 2 générations. Des analyses par Southern Blot et par PCR montrent que des délétions des séquences intégrées ont lieu aussi bien dans les plantes ayant une ou plusieurs copies du transgène.

Mots clés : Chicorée - *Chichorium intybus* - Stabilité des transgènes - 35S CaMV - Gènes *uidA* / *npt II* - Kanamycine - Analyse moléculaire

Stability of chicory (*Chichorium intybus*) transgenes

The F₁ and F₂ generations of chicories transformed with pTDE4 strain where the *uid A* gene is under 35S CaMV promoter and *npt II* gene under the *nos* (nopaline synthase) promoter were analysed in order to check both transmission and stability of the transgene through two generations. Southern and PCR analysis showed that deletion of integrated sequences occurred in plants containing multiple copies but single copies as well.

Key words : Chicory - *Chichorium intybus* - Transgene stability - 35S CaMV - *uid A/npt II* genes - Kanamycine - Molecular analysis

¹ Laboratoire d'Amélioration et de Productions Végétales, Université Mohamed 1er, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Route Sidi Maâfa, Oujda - Maroc

^a Auteur correspondant e-mail : belabed@sciences.univ-oujda.ac.ma

INTRODUCTION

La transgénèse est une méthode permettant d'élargir la variabilité au sein d'une espèce et d'améliorer le rendement des plantes cultivées. La commercialisation des plantes transgéniques sera probablement l'un des faits marquants du début de 21^{ème} siècle. Des variétés transgéniques des principales espèces agricoles sont cultivées, de plus en plus, dans tous les pays. Ces variétés possèdent des résistances aux agents pathogènes ou des caractères biochimiques et physiologiques originaux. Des perspectives d'applications sont attendues pour l'amélioration des productions végétales à des fins alimentaires, médicinales et industrielles. Par ailleurs, les techniques de transformation génétique ont été diversifiées et appliquées à de nombreuses espèces végétales. *Agrobacterium tumefaciens* se présente comme un vecteur biologique largement utilisé pour transférer un segment bien défini d'ADN aux génomes des plantes. De ce fait, pour améliorer le rendement des cultures, l'ADN étranger inséré dans le matériel génétique végétal doit être stable et se transmettre de façon mendélienne au cours des générations suivantes.

Cichorium intybus L. appartient à des espèces cultivées de grande importance. Elle est utilisée aussi bien pour la production du bourgeon étioilé, le chicon, consommé comme salade (endive) que pour l'accumulation de l'inuline dans la racine tubérisée de la variété Magdeburg. Représentant presque 85% du poids sec de la racine, l'inuline (carbohydre sous forme de glucofructane) est une forme de stockage, source majeure de fructose à des fins alimentaires. Vijn *et al.* (1997) ont transformé la chicorée avec un ADNc codant pour les fructanes : fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) de l'oignon contrôlé par le promoteur 35 S CaMV permettant ainsi la conversion des types de fructanes qui s'accumulent dans la chicorée.

La chicorée est une astérocée bisannuelle. C'est une plante allogame. Toutefois cette allogamie n'est pas stricte. En effet, les analyses par les techniques RAPD ont montré que le taux d'allogamie pouvait varier de 60 à 95% chez les variétés cultivées (Bellamy, 1995) et des semences peuvent être produites par autofécondation en répartissant manuellement le pollen sur les fleurs.

Dans cette étude, on se propose de déterminer la stabilité des transgènes dans la descendance de la chicorée transformée. Ainsi, indépendamment du nombre de copies insérées, la perte d'un ou des

deux transgènes est notée. Cependant, la progéniture d'autres plantes parentales maintient une intégration stable de l'ADN-T.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel Végétal

La chicorée a été préalablement transformée à l'aide d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétale de Lille I (Abid *et al.*, 1995). Cette souche contient le plasmide pTDE4 (Figure 1) où le gène *uid A* codant pour la β -glucuronidase, utilisé comme gène rapporteur, est régulé par le promoteur 35 S CaMV et le gène *npt II* codant pour la néomycine phosphotransférase, utilisé comme marqueur de sélection, est dirigé par le promoteur nos de la nopaline synthase (Abid *et al.*, 1995). Les transformants des différentes générations ont été vernalisés en les gardant pendant deux mois à 4°C avant de les placer en serre à 22°C pour la floraison et l'autofécondation. Les plantes des générations F₁ et F₂ ont été analysées pour la transmission et l'intégration des transgènes.

2. Analyse de la descendance

Après deux mois de culture en serre, des hampes florales se sont développées et des boutons floraux ont commencé à s'ouvrir. Les plantes sont fertiles et une autofécondation a été réalisée manuellement par répartition du pollen sur les stigmates, en conditions contrôlées (en espaçant suffisamment les plantes entre elles, en lavant les doigts à l'alcool et en les séchant après chaque pollinisation) afin d'éviter le passage du pollen sur les différentes plantes transgéniques. Les plantes obtenues après ces croisements sont morphologiquement identiques aux parents.

Les akènes obtenues, après un mois, par autofécondation des plantes-mères sont stérilisées et mises à germer sur le milieu H₂₀ (milieu de Heller avec 20 g/l de saccharose). Au bout de 48 h, les graines germées sont de nouveau transférées sur le même milieu avec 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de kanamycine afin de sélectionner les transformants de la génération F₁ résistants à cet antibiotique. Les plantes de la génération F₂ ont été obtenues par autofécondation des F₁.

Les plantes de la génération F₁ testées sont celles de la lignée 1 (1-3, 1-4 et 1-6) de la lignée 2 (2-2, 2-3 et 2-4), de la lignée 4 (4-1, 4-2) et de la lignée 7 (7-4, 7-7).

Les plantes de la génération F₂ testées sont celles des lignées :

- 1 (1-1-2, 1-1-8, 1-1-16, 1-1-19 et 1-4-5) ;
- 2 (2-2-4, 2-2-6, 2-2-10, 2-2-21, 2-2-22, 2-3-1 et 2-4-3) ;
- 4 (4-1-16, 4-2-21, 4-11-2, 4-11-4, 4-11-7 et 4-11-9).

3. Analyse par PCR

La PCR a été utilisée pour la vérification de l'intégration des transgènes dans le génome des plantes. Des oligonucléotides (25mer) ont été choisis par l'intermédiaire du logiciel oligo et synthétisés par Eurogentech.

Pour l'amplification d'un fragment spécifique du gène *uid A*, deux oligonucléotides U1 et U2 distants de 500 nucléotides ont été choisis avec comme séquence pour :

- U1 : 5' CGT TTC GCG TCG GCA TCC GGT CAGT3'

- U2 : 5' TTA CGC GTT GCT TCC GCC AGT GGC G3'

Chaque réaction est menée, dans un microtube à paroi fine de 0,5 ml, dans un volume total de 20 µl contenant 100 ng d'ADN génomique, 150 µl de dNTP, 150 ng de chaque amorce, 2µl de tampon dix fois concentré et 0,75 unité d'enzyme Taq polymérase (Pharmacia).

Les tubes sont maintenus dans de la glace, pour éviter le déclenchement de la réaction. Le mélange réactionnel est recouvert d'une goutte d'huile de paraffine stérile de manière à limiter l'évaporation des produits. Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur Techné. L'ADN subit dans un premier temps une dénaturation de 4 min à 94°C. Il est ensuite amplifié au cours de 30 cycles. Chaque cycle se compose :

- d'une étape de dénaturation: 1 min à 94°C
- d'une étape d'hybridation des amorces : 1 min à 55°C
- d'une étape d'élongation des amorces : 1 min à 70°C

Ces cycles sont suivis d'une élongation finale de 10 min à 70°C. Les produits de la PCR sont déposés et mis à migrer sur gel d'agarose à 0,8% contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg.ml⁻¹. Le tampon

d'électrophorèse utilisé est le TAE (Tris HCl 40 mM ; acide acétique (glacial) ; EDTA 1 mM pH 8). Les fragments d'ADN amplifiés sont détectés sous éclairage UV.

4. Analyse moléculaire des plantes transgéniques

L'ADN génomique a été extrait à partir de feuilles de plantes transformées et non transformées selon le protocole de Dellaporta *et al.* (1983). Dix µg d'ADN ont été incubés pendant 12 h à 37°C dans un mélange de spermidine 5 mM, en présence de 10 unités d'enzyme de restriction Hind III et de 3 µl de tampon de réaction enzymatique, le volume final étant ajusté à 30 µl à l'aide d'eau distillée stérile. Les extraits digérés sont chargés sur un gel d'électrophorèse TAE contenant de l'agarose à 0,8% . La migration s'effectue pendant une nuit sous un potentiel de 30 V.

La digestion par Hind III a été choisie, car cette enzyme coupe l'ADN-T en deux fragments : l'un comprend une partie du gène *uid A*, l'autre comprend le gène *npt II*. L'ADN-T contient un seul site de restriction Hind III (Figure 1). Le site suivant se trouve dans l'ADN flanquant de la plante.

Le transfert de l'ADN se fait selon la technique de Southern (1975) sur une membrane de nylon hybond-N⁺ (Amersham). Après transfert, l'ADN est fixé sur la membrane par cuisson à 80°C pendant 2 h. L'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% de formamide et de 10% de dextran sulfate. Une séquence d'ADN purifiée et contenant soit un fragment du gène *uid A* obtenue après digestion de l'ADN-T du plasmide par les enzymes EcoR V / BamH I, soit du gène *npt II*, obtenue après digestion du plasmide par Nco I / Bgl II (Figure 1), a été marquée avec le P³² selon le protocole de Feinberg & Vogelstein (1984). Les deux sondes sont utilisées séparément sur la même membrane. Pour la déhybridation, les membranes sont incubées à 60°C dans du SSC 0,1 M, du SDS à 0,1% et du Tris- HCl 0,2 M (pH 7,5). Les membranes ont été enveloppées dans du Saran et autoradiographiées afin de s'assurer qu'il ne reste aucune trace de la sonde.

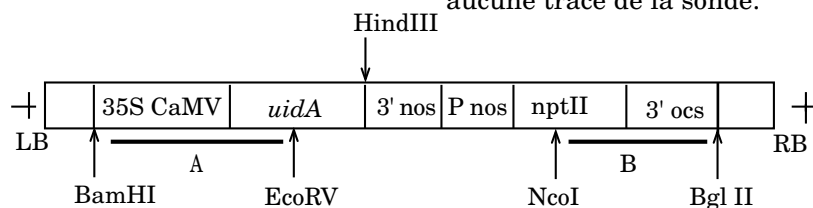


Figure 1. Présentation schématique de l'ADN-T du vecteur pTDE4

L'hybridation avec ces sondes révélerait un ou plusieurs fragments des transgènes intégrés.

RÉSULTATS

Six plantes transgéniques indépendamment transformées ont été analysées pour déterminer le taux de ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine chez la génération F₁. Les plantes 4 et 7 (possédant une copie du transgène) montrent une ségrégation mendélienne alors que les plantes 1 et 2 (possédant plusieurs ADN -T dans leur génome; plante 1 : 3 copies du gène *uid A* et 4 copies du gène *npt II*; plante 2 : 3 copies du gène *uid A* et 5 copies du gène *npt II*) présentent un taux de ségrégation inversé (Abid *et al.*, 1995). Les plantes de la F₁ sont vernalisées et après autofécondation, les akènes sont mises à germer sur le milieu H₂₀ contenant de la kanamycine.

Les résultats du caractère de résistance à la kanamycine des plantes sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1. Ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine des plantes transgéniques de chicorée issue d'une génération F₂

Plantes testées	Nombre de plantules résistance	Nombre de plantules sensibles	% de résistantes	Test-X ₂
4-1	56	15	79	0,56
4-2	62	19	76,5	0,095
7-4	36	10	78	0,25
7-7	25	11	69,4	0,58
1-3	22	8	73	nd
1-4	52	4	92	nd
1-6	19	10	65	nd
2-2	24	51	32	nd
2-3	32	63	33	nd
2-4	19	48	28	nd

Les plantes de la lignée 1 et 2 ont plus d'une copie du transgène. La valeur du test X₂ = 3, 83 implique une déviation significative du taux de ségrégation attendu 3 : 1.

nd : non déterminé, du fait que le nombre de copies est élevé et que les insertions des copies sont indéterminées ; les résultats théoriques attendues ne sont pas connus.

Le test X₂ montre que toutes les plantes qui ont une copie du transgène présentent un taux de ségrégation qui suit le mode mendélien. Les transgènes sont transmis à la génération F₂ comme un caractère dominant et ségrège suivant un ratio 3 : 1.

Chez les plantes ayant un nombre de copies élevé, seul un taux de résistance a été évalué. Ce taux correspond au nombre de plantes résistantes sur un milieu contenant l'agent sélectif déduit du nombre total de plantules mises en culture sur le milieu contenant de la kanamycine. Sachant que le nombre de copies est élevé chez ces plantes (plus de trois ADN-T) et que les localisations des inserts ne sont pas connus, il est très difficile de faire le test X² car dans ce cas on ne connaît pas le taux de résistance attendu.

Le taux de résistance (Tableau 1) obtenu sur les plantes testées varie de 28 à 92%. Les plantes issues de la lignée 1 (1-3, 1-4, 1-6) ont un pourcentage de résistance plus élevé que celles qui sont issues de la lignée 2 (2-2, 2-3, 2-4).

Les plantes de la lignée 1 ont un taux de ségrégation très proche des plantes qui ont une copie de transgène (Tableau 1). En effet, ce taux (65% à 92%) suggère une ségrégation mendélienne pour cette génération contrairement à celle des parents où le pourcentage de résistance est très faible (27%). Les ADN-T insérés ségrègent chez les individus de la F₂ comme une seule copie du transgène à caractère dominant.

Les plantes de la lignée 2 ont un faible taux de résistance (28 à 33%) (Tableau 1). Ce taux est comparable à celui des parents (Abid *et al.*, 1995) à savoir un taux de ségrégation inversé (1 : 3) indiquant que la résistance à la kanamycine peut être récessive.

3.1. Vérification de la présence du gène *uid A* par la technique PCR

La coségrégation du gène *uid A* a été également vérifiée en faisant une analyse moléculaire par PCR sur quelques plantes de la génération F₂. Les amorces sont distantes de 500 nucléotides. Si le gène *uid A* est intégré dans le génome de la plante, un fragment de 500 pb sera amplifié par PCR.

L'ADN génomique des plantes non transformées (T-) a été utilisé comme témoin négatif. L'ADN des transformants est alors soumis au test. Pour une très grande majorité des plantes, un amplificat de 500 pb (Tableau 2) a pu être visualisé sous éclairage par UV après électrophorèse des produits PCR, témoignant de la présence du gène *uid A* dans leur génome. À l'exception de trois plantes de la lignée 4 : 4-11-28, 4-11-33 et 4-11-38, le gène *uid A* est présent. Chez ces plantes, des délétions de ce gène ont pu avoir lieu lors des

recombinaisons génétiques pendant la méiose. De plus, toutes les plantes testées ont été sélectionnées sur un milieu contenant l'agent sélectif. Donc, leur ADN-T est entier. Le gène *uid A* est présent et coségrège avec le gène *npt II*.

Tableau 2. Résultats des tests PCR des plantes de la génération F₂ obtenues par transformation à l'aide de la souche pTDE4

Plantes testées	Résistance à la kanamycine	Présence du gène <i>uid A</i>	plantes testées	Résistance à la kanamycine	Présence du gène <i>uid A</i>
1-1-2	+	+	4-11-19	+	+
1-1-8	+	+	4-11-22	+	+
1-1-16	+	+	4-11-23	+	+
1-1-19	+	+	4-11-24	+	+
2-2-4	+	+	4-11-28	+	-
2-2-6	+	+	4-11-29	+	+
2-2-10	+	+	4-11-31	+	+
2-2-21	+	+	4-11-33	+	-
2-2-22	+	+	4-11-38	+	-
4-11-2	+	+	4-11-48	+	+
4-11-4	+	+	4-11-49	+	+
4-11-7	+	+	4-11-51	+	+
4-11-9	+	+	4-11-54	+	+

3.2. Analyse par Southern blot de la génération F₁

Afin de déterminer le nombre de copies et la stabilité de l'intégration des transgènes chez la génération F₁, une analyse moléculaire a été entreprise chez cette descendance. L'ADN a été extrait à partir de ces plantes et a été digéré par l'enzyme de restriction Hind III. Les hybridations

sont faites séparément sur le même "blot" en utilisant les sondes *uid A* et *npt II*. Une instabilité de l'intégration a été notée pour certaines lignées comme la plante 7 (Figure 2A et B). Le profil d'hybridation de la plante parentale montre une copie complète de l'ADN-T. Cinq plantes de cette progéniture ont été analysées. Trois d'entre-elles, comme la plante 7-4, montrent une perte du gène de la β -glucuronidase, alors que les autres plantes montrent un profil d'intégration identique à la plante parentale à savoir le maintien de la copie du gène *uid A* détectée à 8 Kb (Figure 2A). La copie du gène *npt II*, quant à elle, est conservée chez toutes ces plantes. Elle est détectée à 4,5 Kb (Figure 2B) comme sur le génome de la plante parentale.

La perte des deux transgènes a été observée chez les plantes issues d'une autofécondation de la plante 2. Chez cette dernière, la présence de trois copies du gène *uid A* et de cinq copies du gène *npt II* a été détectée chez la plante parentale (Abid *et al.*, 1995) suggérant que l'ADN est fragmenté lors du transfert ou au cours de sa recombinaison avec le génome végétal produisant ainsi des ADN-T incomplets. Chez la descendance de cette lignée, la perte de deux copies du gène *uid A* et de trois copies du gène *npt II* (Figure 2A et B) a été notée. Ainsi, chez cette lignée, une seule copie du gène *uid A* (fragment de 7 Kb) et deux copies du gène *npt II* (fragments de 4,5 et 8 Kb) ont été conservées. D'une façon surprenante, certaines plantes ont une copie *npt II* présente à 8 Kb. Ceci, étant déjà trouvé chez la plante parentale, laisse supposer que l'insertion de l'ADN-T à 8 Kb fournit une intégration plus stable des transgènes.

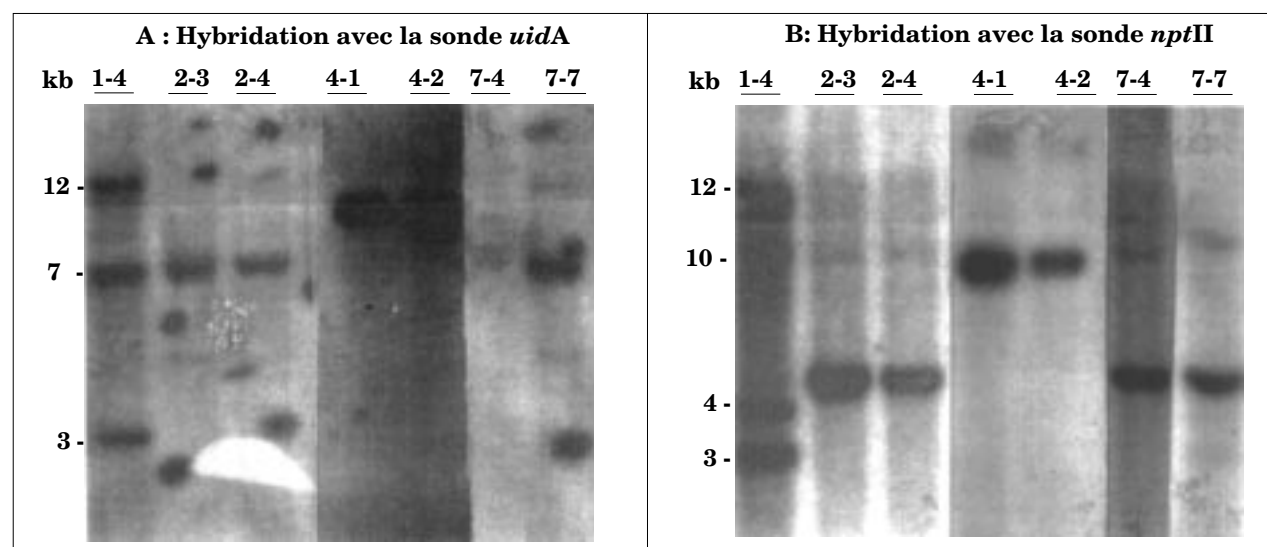


Figure 2. Analyse par Southern blotting des plantes de la génération F₁ de chicorée transformée. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction Hind III

L'intégration de multiples copies de l'ADN-T présente davantage de recombinaisons durant le processus de méiose entraînant des délétions des transgènes. Une intégration stable des transgènes a été observée chez les plantes de la lignée 4 : 4-1 et 4-2. En effet, ces plantes contiennent une copie entière de l'ADN-T comme chez la plante parentale, montrant, d'une part, une ségrégation mendélienne des transgènes chez cette progéniture et, d'autre part, que le processus de recombinaison n'a pas provoqué de délétions des transgènes.

De la même façon, les descendants de la lignée 1 maintiennent le même profil d'intégration que la plante parentale à savoir trois copies du gène *uid A* et quatre copies du gène *npt II* (Figure 2 A et B). L'ADN-T a été déjà fragmenté durant le processus du transfert et de l'intégration produisant ainsi des copies incomplètes avec perte d'une insertion du gène *uid A*. Les trois copies de l'ADN-T en plus d'une copie incomplète ont été transmises à la descendance sans réarrangement ou délétions lors du processus de recombinaison suggérant que les transgènes ségrégent comme une seule unité.

Chez les lignées 4 et 7, la ségrégation du gène *npt II* suit les proportions mendéliennes (3/4 de résistants pour 1/4 de sensibles). Pour les plantes 1 et 2, ce taux est inversé (une plante résistante pour trois plantes sensibles à la kanamycine). Ainsi, la transmission des transgènes suivant le modèle mendélien est dépendante d'un profil de transmission stable ou instable. Elle est en étroite corrélation avec une seule copie de l'ADN-T.

3.3. Analyse par "Southern blot" de la génération F₂

L'analyse génomique de la descendance de deuxième génération (F₂) de la lignée 2 montre la présence d'une copie du gène *uid A* à 7 kb et de deux copies du gène *npt II* à 4,5 kb et à 8 kb (Figure 3A et B). Ce profil d'hybridation est identique à celui de la descendance de la première génération (F₁). Une stabilité des transgènes chez cette lignée semble se mettre en place.

Les descendants de la F₂ de la lignée 4 montrent aussi une stabilité de la transmission des transgènes. Une copie du gène *uid A* et une copie du gène *npt II* ont été retrouvées sur le profil d'hybridation (Figure 3A et B). Les transgènes coségrégent et restent conservés au fil des générations.

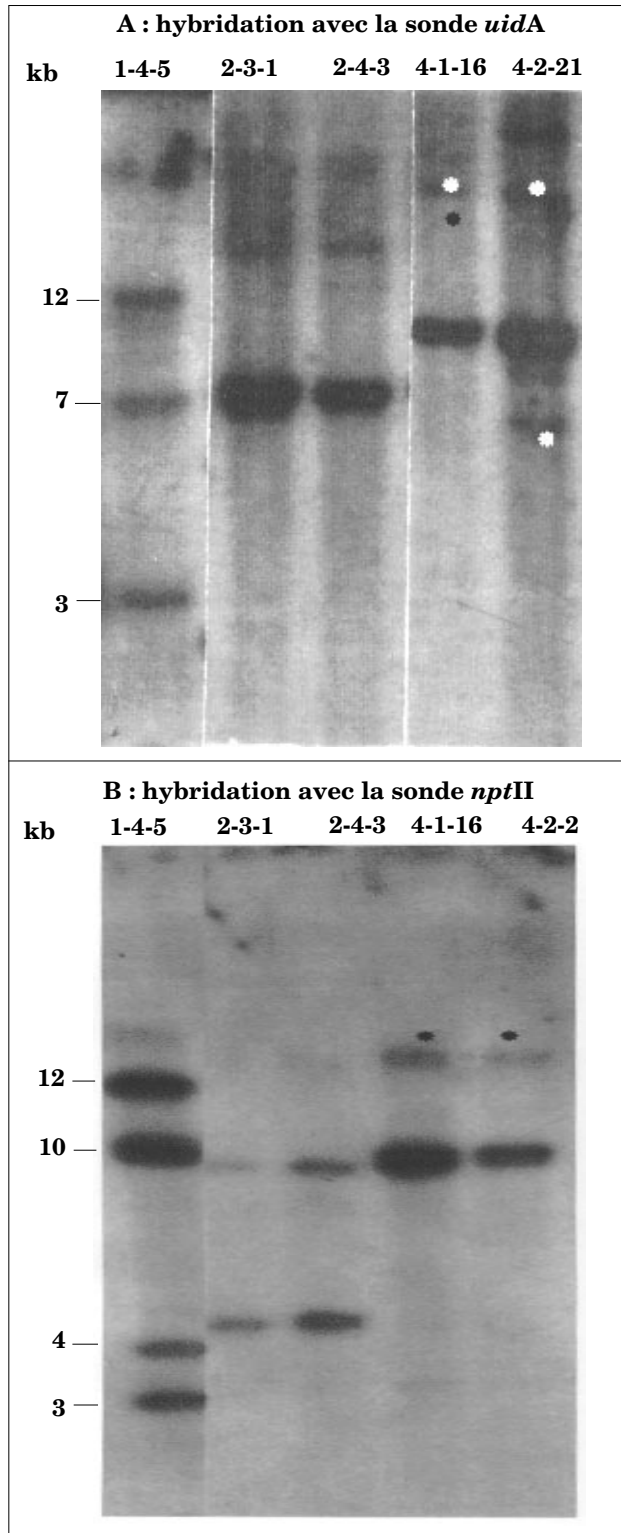


Figure 3. Analyse par Southern blotting des plantes de la génération F₂ de chicorée transformées. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction Hind III

* Fragments issus d'une digestion partielle de l'ADN

Les plantes de la lignée 1 conservent le même profil d'hybridation que celui des parents et ceux des descendants de la F₁ (Figure 3A et B). L'insertion de l'ADN-T reste stable depuis les parents, bien que le nombre de copies soit élevé.

Un résultat identique a été trouvé chez le Kalonchoe (Ryutaro & Michio, 1996 ; Yao *et al.*, 1999). L'insertion des différentes copies est très proche dans le génome ce qui a donc fourni un profil similaire entre les générations.

DISCUSSION

Les résultats de l'analyse moléculaire de plusieurs plantes transformées par la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le vecteur pTDE4 montrent que le nombre de copies de l'ADN-T intégrées dans le génome varie d'une à cinq. Certaines copies sont incomplètes ou réarrangées. Les plantes analysées présentent des insertions de l'ADN-T à différents endroits.

Ceci confirme que L'ADN est transféré dans différents sites du génome des plantes et que *Agrobacterium* peut transférer une seule ou plusieurs copies de l'ADN-T. Cependant, celles-ci peuvent s'insérer au niveau du même site d'excision dans le génome végétal (Salomon & Puchta, 1998). Ceci implique, d'une part, que les sites d'excisions jouent un rôle important dans l'insertion de l'ADN-T et, d'autre part, que le nombre d'excisions dans le génome doit être limité.

Suite à ces événements, l'expression des gènes pourrait être influencée par les séquences d'ADN adjacentes, le phénomène de réarrangement, la méthylation de l'ADN-T inséré et par le nombre de copies présentes dans le génome végétal. Souvent, les plantes ayant un nombre de copies élevé montrent un faible taux d'expression du gène introduit (Hobbs *et al.*, 1990).

L'analyse moléculaire des chicorées transgéniques issues d'autofécondation des parents a montré une stabilité dans la transmission de l'ADN-T chez les plantes appartenant aux lignées 1 et 4 et chez quelques plantes de la lignée 7.

La plante 1 bien qu'elle ait un nombre de copies de l'ADN-T élevé (3 copies du gène *uid A* et 4 copies du gène *npt II*) a montré un profil moléculaire similaire à celui des parents. Ces copies sont probablement étroitement liées dans le génome, ce qui a empêché certainement toutes pertes de

copies ou tout rajout de copies dû à des événements de recombinaisons comme rapporté sur le kalonckoe par Ryutaro & Michio (1996).

La plante 7, malgré qu'elle ait une copie des transgènes, certaines plantes de sa descendance (plante 7-4) ont montré une perte du gène *uid A*. Ainsi, les délétions peuvent concerner les plantes ayant une ou plusieurs copies du transgène.

Par ailleurs, un nombre significatif de plantes présente une ségrégation anormale de l'ADN-T due à une perte de certains fragments. Certaines insertions de l'ADN-T sont instables ou sont excisées totalement ou partiellement durant la ségrégation comme la plante 2 où la perte de quelques transgènes s'est faite après une génération de croisement. L'instabilité est en relation avec l'insertion de copies multiples favorisant ainsi des événements de recombinaisons entre les séquences homologues entraînant des délétions des transgènes.

Dans notre cas, les délétions d'une partie des séquences intégrées concernent aussi les plantes contenant une ou plusieurs copies de l'ADN-T. Une transmission anormale de transgène a été rapportée par certains auteurs (Busing & Benbow 1994 ; Ryutaro & Michio, 1996). Chez le lin, une ségrégation irrégulière a été expliquée par le fait que les plantes sélectionnées étaient composées par des cellules transformées et d'autres non transformées (Dong & McHughen, 1991).

Vermeulen *et al.* (1992) ont aussi rapporté des réarrangements des séquences de l'ADN-T et un taux de ségrégation anormale chez la F₁ des chicorées transgéniques due à la sélection des plantes chimériques. Comme la chicorée est une plante qui se régénère très facilement *in vitro* (Vasseur *et al.*, 1986 ; Dubois *et al.*, 1988), la fréquence de production de plantes chimériques peut être importante.

L'analyse moléculaire des chicorées transgéniques obtenues par autofécondation des F₁ montre une transmission stable de l'ADN-T des plantes appartenant aux lignées 1 et 4. Dans tous les cas, le même profil moléculaire a été retrouvé révélant ainsi une stabilité de l'insertion des transgènes. La descendance de la plante 2 (2-2-2, 2-2-119) réserve une copie du gène *uid A* et deux copies du gènes *npt II* et aucune délétion n'a été retrouvée sur le nouveau profil moléculaire. Tout se passe comme si la stabilité des transgènes est acquise. La

présence du gène *uid A* dans le génome de la descendance a été également vérifié à l'aide d'une analyse PCR. Presque toutes les plantes sélectionnées sur kanamycine présentent le gène marqueur *uid A*. Ainsi, toutes ces plantes possèdent le gène *uid A* et le gène de sélection *npt II*. Ces deux gènes coségrègent en même temps.

L'analyse de la descendance F_1 obtenue par autofécondation des parents montre une ségrégation de type mendélienne pour les plantes ayant une copie de l'ADN-T (plantes 4 et 7) alors que pour la descendance de la plante 2, le taux de ségrégation est très faible et reste toujours inversé. Ainsi, la transmission mendélienne du gène de résistance à la kanamycine semble être en corrélation avec la présence d'une copie de l'ADN-T

Curieusement, la descendance de la plante 1 montre une ségrégation de type mendélien alors que les parents avaient une ségrégation inversée. L'analyse moléculaire de la progéniture de cette plante révèle que les insertions des ADN-T sont très rapprochées indiquant une insertion multiple en tandem de l'ADN-T.

Le fait que le taux de ségrégation soit redevenu normal, comparé à celui des parents, peut provenir d'une activation des transgènes. La répression des transgènes chez les parents peut être due à une inactivation du transgène par méthylation ou à une co-suppression (Ingelbrecht *et al.*, 1994 ; Bellucci *et al.*, 1999). Il est probable que l'intégration de l'ADN-T s'est faite initialement dans des zones hautement méthylées.

Ainsi, chez la progéniture de pétunia et du blé, les graines n'expriment qu'un transgène alors que les deux autres restent inactifs (Tingay *et al.*, 1997 ; Yao *et al.*, 1999). Ceci peut être dû à une interaction entre les loci rendant ainsi les transgènes silencieux (Stam *et al.*, 1997). La dérèpression des transgènes dans la génération F_1 a rétabli une transmission stable du caractère de résistance à la kanamycine. Ryutaro & Michio (1996) ont rapporté, chez le kalonckoe, une ségrégation de l'activité GUS très élevée chez certaines plantes de la descendance alors quelle était proche de zéro chez la plante parentale.

Ce résultat suggère que certains facteurs qui ont empêché l'expression du gène GUS ont été éliminés du génome de la progéniture.

Toutes les plantes testées sont formées par une population contenant des hétérozygotes et des homozygotes. Un pourcentage de sensibilité est toujours retrouvé à chaque génération, mais avec une décroissance dans le taux de plantes sensibles.

CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence un réarrangement de l'ADN-T durant le processus de transformation chez les premiers régénérants de la chicorée. De même, une instabilité de l'ADN-T chez la descendance de certaines lignées ainsi qu'une transmission non mendélienne du caractère de résistance à la kanamycine ont été observés. L'expression des transgènes est modifiée chez les plantes ayant un nombre de copies élevés.

Les plantes qui ont une seule copie du transgène présentent, dans la plupart des cas, une stabilité de l'intégration des transgènes et une transmission mendélienne des gènes introduits. Pour de nombreuses applications, il est assez important de sélectionner les transformants qui expriment de façon stable les transgènes, avec un niveau élevé et ceci à travers de nombreuses générations.

L'objectif d'un programme de création de plantes transgéniques est de sélectionner des lignées dont le niveau d'expression du transgène est maximal et stable. Ainsi, dans le cas de la résistance aux insectes ou à des herbicides, la protection conférée sera élevée lorsque la protéine qui en est responsable est abondante dans la plante.

Une protéine présentant un intérêt thérapeutique sera d'autant plus aisée à purifier qu'elle représente une fraction élevée des protéines de la plante transgénique. Les plantes qui ont une seule copie du transgène pourront être sélectionnées pour une telle application.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Abid M., Palms B., Deryke R., Tissier J-P. & Rambour S. (1995) Transformation of chicory and expression of the bacterial *uid A* and *npt II* genes in the transgenic regenerants. *J. Exp. Botany* 46 (284) : 337-346
- Bellucci M., Alpini A., Paloci F., Damiani F. & Arcioni S. (1999) Transcription of maize cDNA in *Lotus corniculatus* is regulated by T-DNA methylation and transgene copy number. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 257-264

- Buisson C.M. & Benbow R.M. (1994) Molecular analysis of transgenic plants generated by microprojectile bombardment : effect of petunia transformation booster sequence. *Mol. Gen. Genet.* 243 : 71-81
- Dellaporta S., Wood J. & Hick J. (1983) A plant DNA miniprep; version II. *Pl. Mol. Biol. R 1* : 19-21
- Dubois T., Dubois J., Guedira M. & Vasseur J. (1988) Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoides. *C. R. Acad. Sci. Paris 307, Série III* : 669-675
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1984) Addendum : a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137 : 266
- Hobbs S.L.A., Kopdar P. & Delong C.M.O. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Pl. Mol. Biol.* 15 : 851-864
- Ingelbrecht I., Van Houdt H., Montagu M.V. & Depicker A. (1994) Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10502-10506
- Dong J.Z. & McHughen A. (1991) Patterns of transformation intensities on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 10 : 61-71
- Ryutario A. & Michio S. (1996) Transformation of *Kalanchoe* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. *Plant Science* 121 : 175-185
- Salomon S. & Puchta H. (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* 17 (20) : 6086-6095
- Southern E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517
- Stam M., Mol J.M. & Kooter J.M. (1997) The silence of gene in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79 : 3-12
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S. & Bretell R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant J.* 11 : 1369-1376
- Vasseur J., Lefebvre R. & Backoula E. (1986) Sur la variabilité de la capacité rhizogène d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof cultivés *in vitro* : influence de la dimension des explants initiaux et de la durée de conservation des racines au froid. *Can. J. Bot.* 64 : 243-247
- Vermeulen A., Vaucheret H., Paulot V. & Chupeau Y. (1992) *Agrobacterium*-mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlosulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Plant Cell Rep.* 11 : 243-247
- Vijn Van Dijken A., Sperenger N., Van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A. & Smmekens S. (1997) Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harboring onion (*Allium cepa* L.) fructan : fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant Journal* 1 : 387-398
- Yao J.L., Cohen D., Vanden Brink R. & Morris B. (1999) Assessment of expression and inheritance patterns of three transgenes with the aid of techniques for promoting rapid flowering of transgenic apple trees *Plant Cell Rep.* 18 : 727-732