

# De la transformation multigénique à la génomique fonctionnelle

A. de Kochko<sup>1</sup>

La possibilité de contrôler l'intégration, l'expression et la transmission de plusieurs transgènes, est une condition nécessaire pour intervenir sur des voies métaboliques complexes ou des caractères agronomiques intéressants souvent déterminés par plusieurs gènes. La transformation multigénique, en dehors de son potentiel d'utilisation en amélioration des plantes, constitue également un extraordinaire outil pour l'étude de la régulation de l'expression génique. La transformation multigénique a montré qu'il est possible d'intégrer d'importantes quantités d'ADN sans perturber de façon notable le comportement de la plante hôte. Il est donc aussi possible d'introduire de grands fragments d'ADN comme des cosmides ou des BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) et certainement aussi des YAC (Yeast Artificial Chromosomes), donnant ainsi une possibilité nouvelle à l'identification des gènes. Nous reportons ici quelques tentatives et applications qui ont déjà été réalisées en utilisant la propriété des génomes de plantes à pouvoir intégrer d'importantes quantités de matériels génétiques exogènes.

Dans une première expérience, destinée à tester la possibilité et les limites de la transformation multigénique (Chen *et al.* 1998), cent vingt-cinq plants de riz transformés indépendamment avec 14 plasmides différents ont été régénérés après co-transformation par bio-

---

<sup>1</sup> IRD, GeneTrop, BP 5045, Montpellier cedex 1, France.

listique de tissus embryogènes, cals et suspensions cellulaires. Une analyse par PCR, utilisant des amorces spécifiques à chaque gène, a montré que plus de 85 % des plantes T0 avaient intégré plus de deux gènes différents et 17 % de ces plantes contenaient plus de 9 transgènes. La plupart des plantes présentaient un phénotype normal en serre (hauteur, nombre de talles...) et 63 % donnèrent des graines viables. L'efficacité de la transformation multigénique était corrélée à la proportion de plasmides présents dans le mélange introduit par rapport au plasmide portant le marqueur de sélection, un gène de résistance à l'hygromycine. Tous les gènes avaient la même probabilité d'être intégrés, indiquant que la nature de la séquence concernée n'intervenait pas. Trois lignées, contenant respectivement 11, 10 et 9 gènes différents, ont été analysées plus en détail jusqu'à la génération T3. L'intégration des différents transgènes avait lieu principalement à un seul locus, rarement deux, et chaque locus ségrégeait de façon mendélienne 3:1. La co-expression de quatre gènes rapporteurs (*uidA*, *bar*, *luc* et *hph*) a été suivie sur trois générations. Il est intéressant de noter que très peu de « silencing » a été observé malgré l'utilisation de seulement deux promoteurs différents dans la totalité des constructions géniques et de vecteurs pratiquement identiques. Une seule plante en T2 a présenté l'extinction de l'activité d'un seul transgène. Cette expérience a montré qu'il était possible d'intégrer, et exprimer, une quantité assez importante de matériel génétique exogène dans le génome du riz sans pour autant entraîner de modifications physiologiques notables de la plante réceptrice.

Dans une deuxième expérience (Sivamani *et al.* 1999), la propriété de pouvoir intégrer et exprimer plusieurs gènes a été utilisée pour transformer du riz avec les trois gènes des protéines de capsides du virus sphérique du tungro du riz (RTSV) et un marqueur de sélection. Ce virus, qui sévit dans certains champs de riz en Asie du Sud-Est, constitue un modèle très intéressant car il ne provoque une épidémie que lorsqu'il est associé à un autre virus totalement différent, le virus bacilliforme du tungro du riz (RTBV). Des plantes exprimant ces trois gènes de capside du RTSV ont montré une résistance accrue à ce virus.

Par ailleurs, nos estimations, grâce à des analyses de type « ADN-blotting » (Southern), ont montré qu'au moins 130 kb et certaine-

ment jusqu'à plus de 300 kb, ce qui correspond à la taille d'un BAC, pouvaient être intégrés en un seul locus dans le génome du riz. Il apparaît donc possible de pouvoir transformer une plante avec ce type de matériel et d'étudier l'expression des gènes portés par ces constructions. Cette propriété avait déjà été utilisée dans une troisième expérience (Song *et al.* 1995) qui a consisté à transformer du riz avec un cosmide de 45 kb sur lequel était présent le gène *Xa21* de résistance à *Xanthomonas oryzae*, une bactérie pathogène du riz, gène identifié chez l'espèce sauvage *Oryza longistaminata*. En testant les plantes transformées avec ce cosmide pour leur comportement vis-à-vis de l'infection bactérienne et en analysant le fragment de cosmide qui avait été intégré dans le génome des plantes résistantes, il a été possible de localiser avec précision le gène *Xa21* sur le cosmide et de l'isoler. Depuis, ce gène a été très fréquemment utilisé pour transformer des variétés élites de riz dans de nombreux laboratoires à travers le monde.

Une quatrième expérience enfin (Gandikota *et al.* 2001) a fait intervenir en co-transformation 3 gènes venant du maïs ; un gène de structure codant pour la chalcone synthase et deux gènes, régulateurs de la chaîne de biosynthèse de l'anthocyanine et dont le produit s'apparente à des transfacteurs intervenant dans la régulation de la transcription. Ces trois gènes présents ensemble ne semblent pas induire plus de modifications que l'introduction seule du gène de structure, qui se traduit par l'apparition d'un pigment rouge sur les cals transgéniques et les jeunes plants transformés. En revanche, si les deux gènes régulateurs sont introduits seuls, aucun effet n'est observé. Il semblerait que dans la variété de riz utilisée, Taipei 309 (*japonica*), la chaîne de biosynthèse de l'anthocyanine soit bloquée au niveau du gène de structure de la chalcone synthase, présent mais sans doute inactif. Il n'est pas possible d'exclure l'inefficacité des gènes régulateurs du maïs chez le de riz. Ceci serait peu probable car ils sont efficaces aussi bien chez *Arabidopsis* que chez le tabac plus éloignées phylogénétiquement du maïs que le riz.

Un succès de la transformation multigénique est la production du « Golden Rice » (Ye *et al.*, 2000). Ce riz, de couleur jaune, synthétise de la provitamine A, oligo-élément nécessaire à la diète humaine dont la carence entraîne plusieurs troubles de la santé dont l'un des plus graves est la cécité. Ce riz résulte de l'introduction

dans le génome du riz, via *Agrobacterium tumefaciens*, de deux gènes de la chaîne de biosynthèse du  $\beta$ -carotène : ceux de la lycopène beta-cyclase (*psy* du narcisse) et de la phytoène désaturase (*crtI* de *Erwinia uredovora*) ainsi que le marqueur de sélection.

Finalement, une autre application possible de la transformation multigénique présentant de très intéressantes perspectives agronomiques, concerne des expériences tendant à transformer le riz, plante en C3, en plante en C4 par l'introduction de gènes du maïs impliqués dans la biosynthèse des sucres (Matsuoka *et al.*, 1998 ; Ku *et al.*, 1999). Pour le moment, ces expériences consistent à introduire ces gènes un par un. Ainsi, les gènes du maïs codant pour la pyruvate orthophosphate dikinase (PDK) et la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) ont été introduits dans le riz. Les plantes transgéniques montrent une activité accrue de la photosynthèse et une meilleure utilisation du CO<sub>2</sub> atmosphérique ce qui laisse présager une augmentation importante du rendement.

En conclusion, toutes les expériences décrites ici sommairement et dont la liste est loin d'être exhaustive, donnent un aperçu des possibilités nouvelles qu'offre la transgénèse, via la transformation multigénique ou par l'introduction de grands fragments d'ADN. Cette avancée aura indéniablement des répercussions non seulement dans l'amélioration des plantes mais aussi pour les études de génomique fonctionnelle.

#### Remerciements :

L'auteur remercie vivement tous ses anciens collègues de l'IITab et de l'université d'Hyderabad qui ont contribué activement à certaines des expériences décrites dans cet article.

Plus particulièrement : L. Chen, P. Marmey, N. J. Taylor, J-P. Brizard, C. Espinoza, P. D'cruz, H. Huet, S. Zhang, E. Sivamani, G. Madhuri, N. Ithal, A. Reddy, R. N. Beachy et C. Fauquet.

## Bibliographie

- Chen L, Marmey P, Taylor N, Brizard JP, Espinoza C, D'cruz P, Huet H, Zhang S, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet C 1998 — Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotechnology* 16: 1060-1064.
- Gandikota M., de Kochko A, Chen L, Ithal N, Fauquet C, Reddy A 2001 — Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin genes and improved blast resistance. *Molecular Breeding* 7 (1) 73-83.
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M 1999 — High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotechnology* 17: 76-80.
- Matsuoka M, Nomura M, Agarie S, Miyao-Tokutomi M, Ku MSB 1998 — Evolution of C4 photosynthetic genes and overexpression of maize C4 genes in rice. *Journal of Plant Research* 111: 333-337.
- Sivamani E, Huet H, Shen P, Ong CA, de Kochko A, Fauquet C, Beachy RN 1999 — Rice plants (*Oryza sativa* L.) containing *Rice tungro spherical virus* (RTSV) coat protein transgenes, are resistant to virus infection. *Molecular Breeding* 5: 177-185.
- Song W, Wang G, Chen L, Kim H, Pi L, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W, Zhu L, Fauquet C, Ronald PC 1995 — A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270: 1804-1806.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I 2000 — Engineering the provitaminA ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.