

# Du riz transgénique pour le tiers monde

Les maladies virales qui affectent les plantes peuvent avoir des conséquences dramatiques sur les rendements des plantes cultivées. L'ILTAB, "International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology", fondé en 1991 par l'Orstom et le Scripps Research Institute (La Jolla, Californie), s'est donné, entre autres objectifs, celui de produire, au moyen du génie génétique,

des plantes tropicales résistantes à des virus sévissant dans de nombreux pays en voie de développement. Le manioc et le riz ont été les premières plantes choisies en raison de leur importance économique. L'ILTAB a maintenant ajouté la patate douce, l'igname, la tomate et la canne à sucre à sa liste de priorités.

**P**our le riz, nous avons ciblé deux maladies virales considérées comme première priorité par la Fondation Rockefeller, de laquelle nous recevons un appui financier dans le cadre de son programme de biotechnologie du riz. La première de ces maladies, le "rice tungro", est due en fait à l'action conjuguée de deux virus, elle affecte le riz dans toute l'Asie du Sud-Est, en Inde et en Chine du sud. La seconde, la panachure jaune du riz, est provoquée par un virus endémique au continent africain.

**UNE STRATÉGIE DE LUTTE EFFICACE ET UNIVERSELLE**

Pour rendre le riz résistant à ces virus, nous avons choisi la Stratégie de Résistance au Moyen de la Protéine de Capside\* (Coat Protein Mediated Resistance Strategy). Le concept de cette stratégie est issu du phénomène naturel dit de "la protection croisée". Dans certains cas d'infection virale, il est possible de protéger les plantes en les infectant au préalable par une souche atténuée du même virus.

Le mécanisme moléculaire de ce phénomène n'est toujours pas élucidé, il semble ne pas être identique pour tous les groupes viraux, mais le rôle de la protéine de capsid a souvent été évoqué. Quand la transformation et la régénération des plantes est devenue possible dans les années 1980, le Pr. Roger Beachy et ses collaborateurs, ont transformé du tabac sensible au virus de la mosaïque du tabac (TMV) avec le gène\* viral codant pour la protéine de capsid. Les plantes produites se sont avérées résistantes au TMV ainsi qu'à des virus proches. Cette méthode a depuis été étendue avec succès à plusieurs plantes pour lutter contre de nombreux virus.

**CONNAITRE LES VIRUS RESPONSABLES**

Les virus responsables des maladies contre lesquelles nous voulons lutter, étaient très mal connus et pas du tout décrits au niveau moléculaire. Il a fallu caractériser ces virus, connaître l'intégralité de leur génome\* afin d'y identifier le ou les gènes codant pour la ou les protéine(s) de capsid; isoler ces gènes, les intégrer dans un vecteur d'expression\*, transformer les plantes au moyen d'un procédé judicieux, régénérer ces plantes transformées, vérifier l'expression du (des) gènes introduit(s), vérifier son (leur) intégration dans le génome de la plante hôte et sa (leur) transmission de manière mendélienne aux générations suivantes et finalement vérifier que la plante transformée est effectivement résistante au virus responsable de la maladie. Le "rice yellow mosaic virus" (RYMV) vi-

constitué par une molécule d'ARN simple brin positif de 4450 bases. Il fait partie du groupe des sobemovirus. Le "rice tungro bacilliform virus" (RTBV), virus responsable des symp-



*Plantules régénérées complètement développées prêtes à être transférées en terre. Photo : Alexandre de Kochko*

tômes de la maladie du rice tungro, est un badnavirus, virus bacilliforme à une seule protéine de capsid dont le génome est constitué par une molécule d'ADN double brin circulaire de 8000 paires de bases.





Plantules émergeant d'un cal soumis à la sélection. Photo : Alexandre de Kochko



A gauche, les plantules transformées régénérées poussent normalement sur un milieu sélectif, à droite les plantules non transformées meurent sur ce même milieu. Photo : Alexandre de Kochko

Le "rice tungro spherical virus" (RTSV), deuxième virus intervenant dans la maladie du rice tungro, sans qui le RTBV ne peut être transmis de plante à plante par le vecteur naturel, est un virus sphérique possédant au moins trois protéines de capsid. C'est un machlovirus dont le génome est un ARN simple brin positif de 12 kilobases.

Chacune des séquences codant pour les protéines de capsid de ces virus ont été isolées et intégrées dans des vecteurs d'expression en aval de différents promoteurs\*. Dans le cas du RTSV, qui a plusieurs protéines de capsid, ce sont un, deux ou trois gènes qui ont été placés sur un seul vecteur.

## PRODUIRE DES RIZ TRANSGÉNIQUES

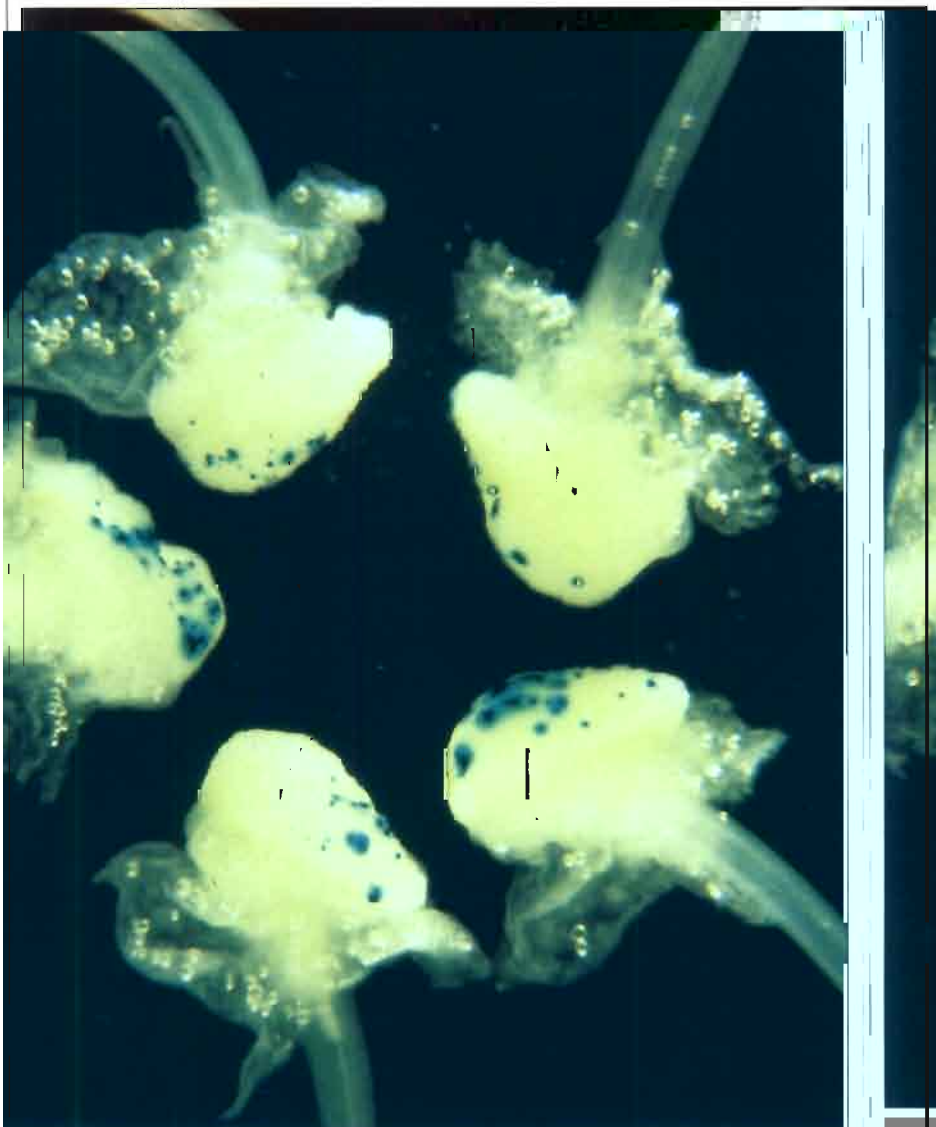
Plusieurs techniques de transformation du riz existent actuellement et sont appliquées par plusieurs laboratoires à travers le monde avec plus ou moins de succès. Les plus couramment utilisées sont :

- la transformation des protoplastes\*.
  - L'électroporation\* de tissus différenciés (embryons...)
  - Le microbombardement, qui peut être appliqué à toutes sortes de tissus. (cf. Orstom Actualités n° 29).
- Nous avons opté pour le microbombardement des embryons immatures, pour les raisons suivantes : l'espèce cul-

## Transgenic rice for the third world

The ILTAB (International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology), has developed a program to produce rice plants resistant to several viruses, using the Coat Protein Mediated Resistance Strategy. The idea is to alter a plant genetically with a viral genome sequence encoding for the coat protein of that virus. Many transgenic plants, expressing the coat protein gene of a variety of plant viruses, have been produced and induction of viral resistance has been demonstrated. An original and effi-

cient technique of rice transformation using particle bombardment of immature embryos has been developed and used successfully to produce hundreds of fertile modified rice plants. Seeds from these plants, containing the CP gene of one of the rice tungro disease viruses, have been sent to the International Rice Research Institute for evaluation of their resistance to virus infection. Many more lines have been produced and seeds will also be sent to Malaysia and China for multilocal evaluation.



Les plantes transformées régénérées poussent normalement dans la serre. Photo : Alexandre de Kochko

tivée du riz *Oryza sativa* a une variabilité génétique très élevée. Elle se répartie en deux sous-espèces, *japonica* et *indica*, qui ont un comportement distinct en culture de tissu. Les variétés de la sous-espèce *japonica* se régénèrent relativement facilement, celles de la sous-espèce *indica* se répartissent de difficilement régénérables à totalement récalcitrantes.

Le microbombardement consiste à introduire du matériel génétique dans n'importe quel tissu au moyen d'un canon à particules. Les embryons immatures sont, jusqu'à ce jour, le stade optimum pour régénérer de nombreuses variétés des deux sous-espèces et obtenir des plantes fertiles. La transformation des protoplastes est assez efficace mais en dehors du fait qu'elle est longue et implique le maintien de suspensions cellulaires, la régénération des protoplastes est difficile, voire impossible, et elle conduit souvent à l'obtention de plantes stériles, surtout pour les riz *indica*.

#### LA "BIOLISTIQUE": UNE TECHNIQUE DE CHOIX POUR LA TRANSFORMATION

La technique de transformation que nous avons privilégiée, a été choisie pour sa simplicité et son universalité.

Les embryons immatures sont isolés, stérilisés et placés sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif. L'ADN transformant est adsorbé sur des particules d'or d'un micromètre de diamètre qui sont "tirées" sur les embryons grâce au canon à particules dont la propulsion est assurée par de l'hélium à haute pression. Les particules pénètrent les cellules des couches superficielles des embryons et l'ADN transformant recombine, dans quelques rares cas, avec l'ADN chromosomique de la plante.

Les embryons sont ensuite placés sur un milieu permettant le développement de cals\*, et ils sont soumis à une pression de sélection assurée par un antibiotique ajouté au milieu nutritif. En même temps que le gène viral de la protéine de cap-

side, on introduit dans la plante un gène de résistance à cet antibiotique qui permet de sélectionner les cellules qui l'expriment. Après plusieurs repiquages sur milieu sélectif, les cals résistants sont placés sur un milieu de régénération qui permet d'obtenir une plante contenant au moins deux nouveaux gènes intégrés dans son patrimoine génétique, celui de résistance à l'antibiotique et celui de la protéine de capsid du virus que l'on veut contrôler.

L'utilisation de cette méthode a conduit à la production de plusieurs centaines de lignées de plantes transgéniques issues de variétés *japonica* et *indica*.

#### VÉRIFIER QUE LA PLANTE EST TRANSFORMÉE

Les plantes sélectionnées sont testées pour la présence et l'expression du gène viral au moyen de différents procédés (ELISA, PCR, Southern blotting, Western blotting...). Les plantes contenant une seule copie du gène viral et dont l'expression est élevée, seront alors soumises à des études de ségrégation et testées pour leur comportement face au virus. Dans le cas du RTBV, pour lequel les résultats sont le plus avancés, nous avons obtenu et analysé plusieurs centaines de plantes régénérées et fertiles issues de plusieurs variétés appartenant aux deux sous-espèces. Des graines d'une dizaine de lignées transformées indépendantes, ont été envoyées à l'IRRI (International Rice Research Institute), aux Philippines afin d'y accomplir les tests de résistance. D'autres graines seront envoyées en Malaisie et en Chine avec qui l'ILTAB a établi des collaborations pour mener à bien des essais multiloaux.

#### LA MEME STRATÉGIE CONTRE D'AUTRES MALADIES VIRALES

Des plantes de riz résistantes au "rice stripe virus", ont été obtenues par deux équipes indépendantes (japonaise et chinoise) grâce à la stratégie décrite ici. Cette stratégie est aussi envisagée par différents laboratoires comme l'un des moyens de lutte contre le "rice hoja blanca virus", qui affecte le riz en Amérique centrale et du sud, ainsi que contre le "rice ragged stunt virus" qui provoque d'importantes pertes de rendement en Thaïlande et dans d'autres pays d'Asie.

Alexandre de Kochko  
Claude Fauquet Département  
"Milieux et activité agricole - UR  
"Bases biologiques de l'amélioration  
des plantes tropicales"

Ce travail a été réalisé à l'ILTAB dont le Pr. Roger N. Beachy est l'un des co-directeurs, avec la participation de Rongda Qu, Liangcai Li, Martin N'Gon A Yassi et Ping Shen et avec le soutien financier de la Fondation Rockefeller et du Scripps Research Institute.

**Glossaire :**

Protéine de capsid : l'association de plusieurs molécules de cette protéine forme l'enveloppe, la capsid, des virus des plantes.

Gène : unité génétique de base qui contient l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine ou d'un ARN ayant un rôle dans le fonctionnement ou la structure de l'organisme.

Génome : intégralité du message génétique d'un organisme vivant constitué par un acide nucléique ADN ou ARN.

Vecteur d'expression : molécule circulaire d'ADN, ou plasmide, dans laquelle on insère le gène à introduire dans un organisme étranger et qui permet l'expression de ce gène dans cet organisme.

Réplication : multiplication du matériel génétique.

Promoteur : séquence d'ADN qui permet la transcription de la séquence située derrière lui (en aval), c'est-à-dire la synthèse d'un ARN correspondant, qui sera lui-même traduit en protéine.

Protoplaste : cellule végétale isolée et débarrassée de sa paroi cellulosique.

Electroporation : technique de transformation qui consiste à introduire du matériel génétique dans des tissus vivants au moyen d'une forte mais très courte décharge électrique.

Cal : amas cellulaire inorganisé.

Expression transitoire : expression d'un gène étranger peu de temps après la transformation et qui ne nécessite pas son intégration dans le génome de l'hôte.

**Pour en savoir plus :**

Qu, R., Bhattacharyaa, M., Laco, G., Kochko de, A., Subba Rao, B.L., Kaniowska, M., Elmer, J. S., Rochester, D.E., Smith, C.E. & Beachy, R.N. (1991) : Characterization of the genome of rice

tungro bacilliform virus : comparison with Commelina Yellow Mottle virus and caulimoviruses. *Virology*, 185 : 354-364.  
Li, L., Qu, R., Kochko de, A., Fauquet, C. & Beachy, R.N. (1993) : An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports*, 12 : 250-255

Powell, A.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S.G., Fraley, R. & Beachy, R.N. (1986) : Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232 : 738-743.

Hayakawa, T., Zhu, Y., Itoh, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K. & Toriyama, S. (1992) : Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 9865-9869.

Fitch, J.H. & Beachy, R.N. (1993) : Genetically engineered protection against viruses transgenic plants. *Annual Review of Microbiology*, 47 : (sous presse)



Protubérances apparaissant sur un cal issu d'un embryon immature transformé soumis à la sélection, ces protubérances évoluent elles-mêmes en cals. Photo : Alexandre de Kochko

